

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 6 月 17 日 (17.06.2004)

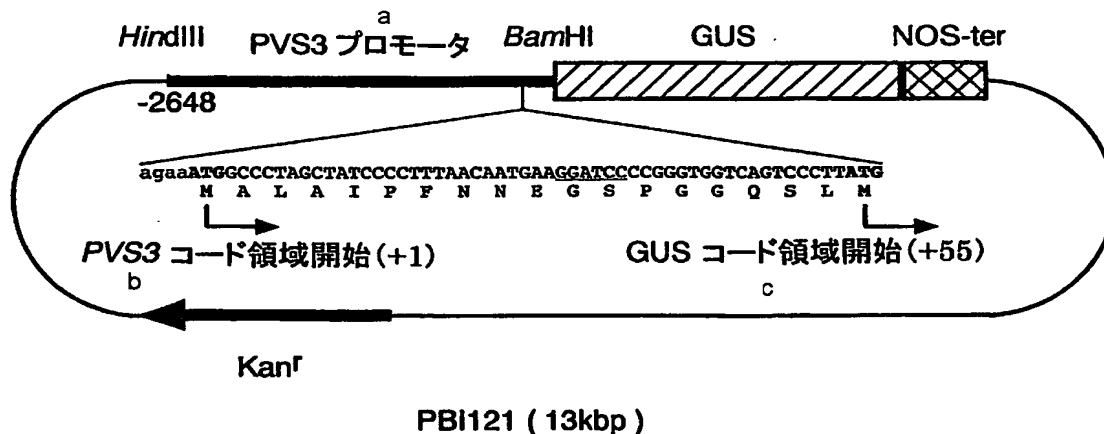
PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/050874 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/11, 15/82, A01H 5/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015310
- (22) 国際出願日: 2003 年 12 月 1 日 (01.12.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-351701 2002 年 12 月 3 日 (03.12.2002) JP  
特願2003-294409 2003 年 8 月 18 日 (18.08.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人名古屋産業科学研究所 (NAGOYA INDUSTRIAL SCIENCE RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒460-0008 愛知県名古屋市 中区栄二丁目10番19号 Aichi (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 吉岡 博文 (YOSHIOKA, Hirofumi) [JP/JP]; 〒464-0071 愛知県名古屋市千種区若水2-2-21 若水住宅4-23 Aichi (JP).
- (74) 代理人: 小西 富雅, 外 (KONISHI, Tomimasa et al.); 〒460-0002 愛知県名古屋市 中区丸の内二丁目17番12号 丸の内エステートビル7階 Aichi (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特
- [続葉有]

(54) Title: GERM-RESPONSIVE PROMOTER

(54) 発明の名称: 病原菌応答性プロモータ



a...PVS3 PROMOTER

b...INITIATION OF PVS3 ENCODING REGION (+1)

c...INITIATION OF GUS ENCODING REGION (+55)

(57) Abstract: It is intended to provide a promoter responding specifically to germ infection (i.e., a germ-responsive promoter). Namely, a germ-responsive promoter containing DNA comprising the PVS3 promoter region (SEQ ID NO:1) of potato plant. A region (SEQ ID NO:23) being important in the promoter activity.

(57) 要約: 病原菌の感染に対して特異的に応答するプロモータ (病原菌応答性プロモータ) を提供する。ジャガイモ植物のPVS3プロモータ領域 (配列番号1) からなるDNAを含む病原菌応答性プロモータが開示される。また、プロモータ活性に重要な領域 (配列番号23) が開示される。

BEST AVAILABLE COPY



許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

## 明 細 書

## 病原菌応答性プロモータ

## 5 技術分野

本発明は病原菌に対する応答性を有するプロモータ及びそれを利用した病原菌耐性植物に関する。

## 背景技術

- 10 ジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) とジャガイモ植物との間においては、明確なレースー品種間の特異的寄生関係が存在する。このような特異的な宿主ー病原菌相互関係は、菌の保有する非病原性遺伝子と、宿主の持つ真性抵抗性遺伝子の組み合わせによって決定する場合が多い。非親和性レースが感染を試みる場合、宿主において動的抵抗反応が誘導される。すなわち、活性酸素生産、
- 15 過敏感細胞死、ファイトアレキシン (ジャガイモにおいてはリシチン) の生成、P R (Pathogenesis-Related) タンパク質の発現、パピラ形成、リグニン化などの過敏感反応を伴う抵抗反応が感染組織において発現し、菌の進展が停止する (文献 1 5、3 2、4 4、4 5、及び 4 7 を参照)。一方、親和性レースが感染する場合、これらの抵抗反応が誘導されず、菌の侵入は進展し、ジャガイモ植物の致命的な
- 20 全身的感染症であるジャガイモ疫病が引き起こされる。

- これら動的抵抗反応の中で、最も重要で局所的な抵抗反応の一つがファイトアレキシンの蓄積であると考えられている。ファイトアレキシンは病原菌の感染時に蓄積誘導され、抗菌作用をもつ低分子の物質であり、感染成否の決定において、
- 25 重要な役割を果たすことが示されてきた (文献 1 2、1 3、2 1、2 8、及び 4 6

を参照)。ジャガイモにおけるファイトアレキシンはセスキテルペン化合物であり、イソプレノイド代謝系で合成される(図1)。

ジャガイモにおいて、エリシター処理や非親和性レースを接種することで、ステロール・グリコアルカロイド合成からセスキテルペノイドファイトアレキシン合成へとイソプレノイド合成が急激に転換することが知られている。この現象は、イソプレノイド合成系の律速段階に関わるステロール・グリコアルカロイド合成経路とイソプレノイドファイトアレキシン合成経路の分岐点にそれぞれ関わるスクアレンセシンターゼおよびセスキテルペンシクラーゼの協調的な制御によるものであると考えられている(文献8を参照)。ジャガイモのセスキテルペンシクラーゼはベティスピラディンシンターゼであり、ポテトベティスピラディンシンターゼ(PVS)と命名された(文献53を参照)。ジャガイモ塊茎組織のPVS活性は、菌接種およびジャガイモ疫病菌菌体壁由来のエリシターであるHWC処理により著しく増加することが報告されている(文献54を参照)。また、タバコ植物においてもエリシター処理により、セスキテルペノイド合成経路が活性化し、ファイトアレキシンの一種であるカプシジオールが合成されることが知られている(文献42及び48を参照)。最近になって、これらの現象が遺伝子発現レベルで明らかとなってきた。ジャガイモにおけるPVSとスクアレンセシンターゼのcDNAを単離し、これらのクローンをプローブとして、ジャガイモ塊茎より抽出したRNAを用いてノーザン解析したところ、親和性および非親和性レース接種区においてPVS mRNAの一過的な蓄積誘導が認められた。その一方で、スクアレンセシンターゼは傷害によってmRNAの蓄積が誘導されるものの、親和性および非親和性レースを接種すると蓄積抑制が観察されることが示されている(文献53を参照)。しかしながら、この報告は、非親和性レースの接種においてのみファイトアレキシンが合成され、菌の進展が停止することと矛盾する(文献40を参照)。

植物の遺伝子の多くは多重遺伝子族を形成しており、各アイソジーンが器官特異性や刺激に応答した代謝変動に対して異なった役割を果たすことが一般的に知られている。ジャガイモ植物における PVS 遺伝子は多重遺伝子族を形成しており、PVS1~4 のメンバーが存在することが報告されている(文献 5 3 を参照)。しかしながら、これらの各メンバーの発現動向についての詳細は未詳である。

(文献 1)

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403-410.

10 (文献 2)

Arumuganathan, K. and Earle, E. D. (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Mol. Biol. Reporter 9, 208-218.

(文献 3)

Back, K. and Chappel, J. (1995) Cloning and bacterial expression of a sesquiterpene cyclase from Hyoscyamus muticus and its molecular comparison to related terpene cyclases. J. Biol. Chem. 270, 7375-7381.

(文献 4)

Back, K. and Chappel, J. (1996) Identifying functional domains within terpene cyclase using domain-swapping strategy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 6841-6845.

20 (文献 5)

Back, K. and Chappel, J. (1998) Cloning and bacterial expression of a sesquiterpene cyclase, a key branch point enzyme for the synthesis of sesquiterpenoid phytoalexin capsidiol in UV-changed leaves of Capsium annum. Plant Cell Physiol. 39, 899-904.

## (文献 6)

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

5

## (文献 7)

Chang, J. H., Tai, Y.-S., Bernal, A. J., Lavelle, D. T., Staskawicz, B. J. and Michelmore, R. W. (2002) Functional analyses of the Pto resistance gene family in tomato and the identification of a minor resistance determinant in a susceptible haplotype. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15, 2

10

81-291.

## (文献 8)

Chappell, J. (1995) The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiol.* 107, 1-6.

## (文献 9)

15 Choi, D., Ward, B. L. and Bostock, R. M. (1992) Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in elicitor arachidonic acid. *Plant Cell* 4, 1333-1344.

## (文献 10)

20 Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

## (文献 11)

Cruickshank, I. A. M. and Perrin, D. R. (1960) The isolation and particular characterization of monilicolin A, a polypeptide with phaseollin-inducing activity from *Monilinia fructicola*. *Life Sci.* 7, 449-458.

25

## (文献 1 2)

Darvill, A. G. and Albersheim, P. (1984) Phytoalexins and their elicitors - a defense against microbial infection in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 243-275.

## 5 (文献 1 3)

Dixon, R. A. and Harrison, M. J. (1990) Activation, structure and organization of genes involved in microbial defence in plants. *Adv. Genet.* 28, 165-234.

## (文献 1 4)

10 Doke, N. and Tomiyama, K. (1980) Effect of hyphal wall components from *Phytophthora infestans* on protoplasts of potato tuber tissue. *Physiol. Plant Pathol.* 16, 169-176.

## (文献 1 5)

15 Doke, N. (1983) Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol. Plant Pathol.* 23, 345-357.

## (文献 1 6)

20 Facchini, P. J. and Chappel, J. (1992) Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11088-11092.

## (文献 1 7)

25 Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA reaction endonuclease fragments to high specific activity. *Biochem.* 136, 6-13.

## (文献 18)

Hashimoto, T., Yamada, T., Tada, A., Kawamata, S., Tanaka, Y., Sripras  
ertsak, P., Ichinose, Y., Kato, H., Izutsu, S., Shiraishi, T., Oku, H. a  
nd Ohtsuki, Y. (1992) Transient expression of a phenylalanine ammonia-ly  
5 ase promoter. Plant Cell Reports, 11, 183-187.

## (文献 19)

Jefferson, R. A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gen  
e fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5, 387-405.

## (文献 20)

10 Katou, S., Senda, K., Yoshioka, H., Doke, N. and Kawakita, K. (1999) A  
51 kDa protein kinase of potato activated with hyphal wall components f  
rom Phytophthora infestans. Plant Cell Physiol. 40, 825-831.

## (文献 21)

Kuc, J. and Rush, R. J. (1985) Phytoalexins. Arch. Biochem. Biophys. 2  
15 36, 455-472.

## (文献 22)

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assem  
bly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

## (文献 23)

20 Leader, P., Tiemerier, D. and Enguist, L. (1977) EK2 derivatives of ba  
cterio-phage lambda useful in the cloning of DNA from higher organisms.  
Science 196, 175-177.

## (文献 24)

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) Molecular Cloni  
25 ng: A Laboratory Manual. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Laboratry)



## (文献 2 5)

McNeil, J. B. (1988) Functional Characterization of a Pyrimidine-Rich Element in the 5'-Noncoding Region of the Yeast Iso-1-Cytochrome c Gene. Mol. Cel. Biol. 8, 1045-1054.

## 5 (文献 2 6)

Metlitsky, L. V., Ozeretskovskaya, O. L., Vasyukova, N. J., Davydova, M. A., Dorozhkin, N. A., Remneva, Z. J. and Ivanyuk, V. G. (1970) Potato resistance to *Phytophthora infestans* as related to leaf phytoalexin activity. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 5, 568-573.

## 10 (文献 2 7)

宮田 隆 (1984) DNA の進化, =ダイナミックに進化する真核生物遺伝子=, 分子進化学入門, 木村資生編, 培風館, 東京, pp. 56-90.

## (文献 2 8)

Moesta, P. and Grisebach, H. (1982) L-0-Aminooxy-3-phenylpropionic acid inhibits phytoalexin accumulation in soybean with concomitant loss of resistance against *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. Physiol. Plant Pathol. 21, 65-70.

## (文献 2 9)

Murai, A., Sato, S., Osada, A., Katsui, N. and Masamune, T. (1982) Biosynthesis from solavetivone of the phytoalexin risitin in potato. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 32

## (文献 3 0)

Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. Nucleic Acids. Res. 8, 4321-4325

## 25 (文献 3 1)

Narita, J. O. and Gruissem, W. (1989) Tomato hydroxy-methylglutaryl-Co A reductase is required early in fruit development but not during ripening. *Plant Cell* 1, 181-190.

(文献 3 2)

- 5 Oba, K., Kondo, K., Doke, N. and Uritani, I. (1985) Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in potato tubers after slicing, fungal infection or chemical treatment, and some properties of the enzyme. *Plant Cell Physiol.* 26, 873-880.

(文献 3 3)

- 10 Ren, D., Yang, H. and Zhang, S. (2002) Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 277, 559-565.

(文献 3 4)

- 15 Rohwer, F., Fritzscheier, K. H., Scheel, D., and Hahlbrock, K. (1987) Biochemical reactions of different tissues of potato (*Solanum tuberosum*) to zoospores or elicitors from *Phytophthora infestans*. *Planta* 170, 556-561.

(文献 3 5)

- 20 Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D. F., Hirt, H. and Jones, J. D. G. (1999) Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* 11, 237-287.

(文献 3 6)

- 25 Reed, K. C. and Mann, D. A. (1985) Rapid transfer of DNA from agarose gel to nylon membranes. *Nucleic Acids Res.* 13, 7207-7221.

## (文献 3 7)

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

## 5 (文献 3 8)

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.

## (文献 3 9)

10 Starks, C. M., Back, K., Chappel, J. and Noel, J. P. (1997) Structure basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi aristolochene synthase. Science 277, 1815-1820.

## (文献 4 0)

15 Stermer, B. A. and Bostock, R. M. (1987) Involvement of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in regulation of sesquiterpenoid phytoalexin synthesis in potato. Plant Physiol. 84, 404-408.

## (文献 4 1)

20 Thomas, C. M., Tang, S., Hammond-Kosack, K. E. and Jones, J. D. G. (2000) Comparison of the hypersensitive response induced by the tomato Cf-4 and Cf-9 genes in Nicotiana spp. Mol. Plant-Microbe Interact. 13, 465-469.

## (文献 4 2)

25 Threfall, D. R. and Whitehead, I. M. (1988) Co-ordinated inhibition of squalene synthetase and induction of enzymes of sesquiterpenoid phytoalexin biosynthesis in cultures of Nicotiana tabacum. Phytochemistry 27, 2567-2580.

## (文献 4 3)

Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673-4680.

## (文献 4 4)

Tomiyama, K. (1968) Further observation on the time requirement for hypersensitive cell death of potatoes infected by *Phytophthora infestans* and its reaction to metabolic activity. Phytopathology 58, 367-378.

## 10 (文献 4 5)

Vance, C. P. and Sherwood, R. T. (1977) Lignified papilla formation as a mechanism for protection in reed canarygrass. Physiol. Plant Pathol. 10, 247-256.

## (文献 4 6)

15 VanEtten, H. D., Matthews, D. E. and Matthews, P. S. (1989) Phytoalexin detoxification: Importance for pathogenicity and practical implications. Annu. Rev. Phytopathol. 27, 143-164

## (文献 4 7)

20 Van Loon, L. C. and Van Kammen, A. (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN'. Virology 40, 199-211.

## (文献 4 8)

Vögeli, U. and Chappel, J. (1988) Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthase activities in plant cell cultures treated with fungal elicitor. Plant Physiol. 88, 1291-1296.

25

## (文献 4 9)

Wilson, U. E. and Coffey, M. D. (1980) Cytological evaluation of general resistance to *Phytophthora infestans* in potato foliage. *Ann. Bot.* 45, 81-90.

## 5 (文献 5 0)

Yang, K. -Y., Liu, Y. and Zhang, S. (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 741-746.

## (文献 5 1)

10 Yin, S., Mei, L., Newman, J., Back, K., and Chappell, J. (1997) Regulation of sesquiterpene cyclase gene expression: characterization of an elicitor- and pathogen-inducible promoter. *Plant Physiol.* 115, 437-451.

## (文献 5 2)

15 Yoshioka, H., Miyabe, M., Hayakawa, Y. and Doke, N. (1996) Expression of genes for phenylalanine ammonia-lyase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in aged potato tubers infected with *Phytophthora infestans*. *Plant Cell Physiol.* 37, 81-90.

## (文献 5 3)

20 Yoshioka, H., Yamada, N. and Doke, N. (1999) cDNA cloning of sesquiterpene cyclase and squalene synthase, and expression of the genes in potato tuber infected with *Phytophthora infestans*. *Plant Cell Physiol.* 40, 993-998.

## (文献 5 4)

25 Zook, M. N. and Kuc, J. A. (1991) Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthetase activity in elicitor treated or fun

gal infected potato tuber tissue. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39, 377-390.

(文献 5 5)

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.

(文献 5 6)

Bhattacharyya, M. K., Paiva, N. L., Dixon, R. A., Korth, K. L. and Stermer, B. A. (1995) Features of the hmg1 subfamily of genes encoding HMG-CoA reductase in potato. *Plant Mol. Biol.* 28, 1-15.

(文献 5 7)

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R. Chiu, W. -L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M., and Sheen, J. (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 415, 977-983.

15 (文献 5 8)

Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehausi, K., Boller, T. and Hirt, H. (2000) Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *J. Biol. Chem.* 275, 36734-36740.

(文献 5 9)

20 Baulcombe, D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 109-113.

(文献 6 0)

Gallagher, S. R. (1992) GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression. 3. Quantitation of GUS activity by fluorometry. Gallagher, ed. San Diego, CA, Academic Press. pp. 47-59.

25

## (文献 6 1)

Hellens, R.P., Edwards, A.E., Leyland, N.R., Bean, S., and Mullineaux, P.M.  
(2000) pGreen: A versatile and flexible binary Ti vector for  
*Agrobacterium*-mediated plant transformation. Plant Mol. Biol. 42: 819-832.

## 5 (文献 6 2)

Kamoun, S., van West, P. V., Jung, A. J., Vleeshouwers, V. G. A. A., Groot,  
K. E. and Govers, F. (1997) A gene encoding a protein elicitor *Phytophthora*  
*infestans* is down-regulated during infection of tomato. Mol. Plant-Microbe  
Interact 10: 13-20.

## 10 (文献 6 3)

Kamoun, S., West, P. V., Vleeshouwers, V. G. A. A., Groot, K. E. and Govers,  
F. (1998) Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is  
mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. Plant Cell 10:  
1413-1425.

## 15 (文献 6 4)

Katou, S., Yamamoto, A., Yoshioka, H., Kawakita., K. and Doke, N. (2003)  
Functional analysis of potato mitogen-activated protein kinase kinase,  
StMPK1. J. Gen. Plant Pathol. 69: 161-168.

## (文献 6 5)

20 MAPK group (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a  
new nomenclature. Trends Plant Sci. 7: 301-308.

## (文献 6 6)

Mitchell, P. J. and Tjian, R. (1989) Transcriptional regulation in  
mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. Science 245:  
25 371-378.

## (文献 6 7)

Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A. M. and Baulcomb, D. C. (2001) Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.* 25: 237-245.

## 5 (文献 6 8)

Reed, K. C. and Mann, D. A. (1985) Rapid transfer of DNA from agarose gel to nylon membranes. *Nucleic Acids Res.* 13: 7207-7221.

## (文献 6 9)

Samuel, M. A. and Ellis, B., E. (2002) Double jeopardy: both overexpression  
10 and supression of a redox-activated plant mitogen-activated protein kinase  
render tobacco plants ozone sensitive. *Plant Cell* 14: 2059-2069.

## (文献 7 0)

Voinnet, O. (2001) RNA silencing as a plant immune system against viruses.  
*Trends genet.* 17: 449-459.

## 15 (文献 7 1)

Yoshioka, H., Numata, N., Nakajima, K., Katou, S., Kawakita, K., Rowland,  
O., Jones, J. D. G. and Doke, N. (2003) *Nicotiana benthamiana* gp91<sup>phox</sup> homologs  
*NbrbohA* and *NbrbohB* participate in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and resistance to  
*Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 15: 706-718.

## 20 (文献 7 2)

Zhang, S., Du, H. and Klessig, D. F. (1998) Activation of the tobacco SLP  
kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified  
proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* 10: 435-449.

## (文献 7 3)

25 Zhang, S. and Liu, Y. (2001) Activation of salicylic acid-induced protein



kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense responses in tobacco. Plant Cell 13: 1877-1889.

(文献 7 4)

Zuo, J., Niu, Q. -W. and Chua, N. -H. (2000) An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. Plant J. 24: 265-273.

#### 発明の開示

植物が備える抵抗反応を利用して病害耐性を強化する試みがなされている。その一つとして、病害応答性プロモータを利用して病害時特異的に抵抗性誘導物質を生成させる方法が検討されている。かかる方法によれば、病害時に特異的かつ迅速な抵抗性誘導物質の生成が行われ、これによって効果的な防御が達成される。

過去にいくつかの病害応答性プロモータが発見されているが、これまでに報告されている病害応答性プロモータは病原菌の感染のみならず傷害又は生育段階においても誘導される場合が多い。したがってこのようなプロモータを用いて抵抗性誘導物質の生成に関与する遺伝子を導入した形質転換植物を作出したとしても、病原菌の感染現場以外（感染時以外）においても導入遺伝子が発現し、これによって植物が害を受けることが予想される。本発明は以上の背景の下なされたものであって、病原菌の感染に対して特異的に応答するプロモータ（病原菌応答性プロモータ）、及びそれを利用した病原菌耐性植物の作出方法等を提供することを目的とする。

本発明者は以上の課題に鑑み、ジャガイモ植物から、その病原菌の代表である疫病菌に対して特異的な応答性を有するプロモータの取得を試みた。まず、ファイトアレキシンの生成に関与する遺伝子であるポテトベティスピラディンシンタ

ーゼ（PVS）に注目し、疫病菌の主な１次感染場所である葉組織における各 PVS  
メンバー（PVS1～PVS4）の発現動向を詳細に検討した。その結果 PVS3 のみが親和  
性レース又は非親和性レースのいずれを接種した場合においても著しく誘導され  
ることが分った。即ち、PVS3 のプロモータは親和性レースの感染に対しても応答  
5 性を示すことが判明した。

次に、ジャガイモゲノムライブラリーを構築し、これを利用して PVS3 の配列の  
解読を試みた。度重なるスクリーニングの末に PVS3 ゲノム DNA 配列を決定するこ  
とに成功した。決定された配列情報を基にして PVS3 プロモータ領域を推定しその  
機能を検討したところ、疫病菌に対する応答性が確認された。当該推定プロモー  
10 タ領域の機能を更に詳細に調べるため、まず GUS 遺伝子の上流に当該推定プロモ  
ータ領域を連結したものを導入したジャガイモ形質転換体を作出した。この形質  
転換体を用いて種々の実験を行った結果、葉組織の切除（傷害）によっては GUS  
染色が認めらず、一方で疫病菌親和性レースの接種によって GUS 染色が確認され、  
このプロモータ領域が疫病菌特異的、即ち病原菌特異的な応答性を示すことが確  
15 認された。

以上のように、本発明者は病原菌の感染に対して特異的に応答するプロモータ  
（病原菌応答性プロモータ）の取得に成功した。このプロモータを利用すれば、  
病原菌に感染したときにのみ特定の遺伝子を発現する植物を作出することが可能  
となる。即ち、当該プロモータを連結した遺伝子を導入して得られる形質転換体  
20 では、病原菌の感染に対して、導入したプロモータが特異的に誘導され、その結  
果導入遺伝子が発現する。導入遺伝子として防御応答を活性化するものを採用す  
れば、病原菌の感染に対して特異的に防御応答が活性化される植物、即ち病原菌  
の感染に対して高い耐性を有する植物の作出が可能となる。

25 ここで、一般に遺伝子の転写は、プロモータ領域内のシス配列と呼ばれる数塩

基から十数塩基の配列に転写活性因子と呼ばれるタンパク質因子が結合することによって開始される（文献 6 6）。したがって、シス配列を特定することが転写機構解明の第一歩となる。このことに鑑み、次に本発明者は、同定に成功した上記推定プロモータの一部を順次削除した PVS3 プロモータ配列と GUS 遺伝子のキメラ

5 遺伝子（PVS3:GUS）を、アグロバクテリウム（*Agrobacterim tumefaciens*）により一過的に葉組織に導入して PVS3 プロモータ活性を調べた。その結果、プロモータ活性に重要な領域である 50bp（配列番号 2 3）の領域を見出した。即ち、PVS3 プロモータ活性の発現に必須と考えられる 50bp の領域を同定することに成功した。尚、現時点においてこの領域中に既知の制御モチーフを見出すことはできな

10 かった。

本発明者が同定に成功した病原菌応答性プロモータ（PVS3 プロモータ）はジャガイモ植物から得られたものであるが、その適用対象はジャガイモ植物に限られるものではないと考えられる。まず第 1 に、PVS3 はジャガイモ植物においてファイトアレキシンの合成を触媒する酵素であるが、ジャガイモ植物と他のナス科植物

15 物はファイトアレキシンの合成経路も共通している。さらに、後述するように本遺伝子は SIPK および WIPK に依存して誘導されるが、一般に、両酵素はナス科植物に限らず多くの植物に共通して防御応答に関与することが知られている。このような多くの共通点を考慮すれば、本発明のプロモータ（PVS3 プロモータ）は、ナス科植物のみ

20 ならず SIPK および WIPK オルソログの重要性が報告されているアブラナ科（文献 5 7 を参照）、マメ科植物（文献 5 8 を参照）を始めとして他の広範な植物においても同様に病原菌応答性プロモータとして利用できると予想される。

25 本発明は以上の研究成果及び知見に基づいて完成されたものであって、以下の

各構成を提供する。

[1] 以下の(a)～(c)のいずれかの DNA を含む病原菌応答性プロモータ、

(a) : 配列番号 1 で示される塩基配列からなる DNA、

(b) : 配列番号 1 で示される塩基配列において 1 若しくは複数の塩基が置換、欠失、挿入、又は付加された塩基配列からなり、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能する DNA、

(c) : (a)又は(b)の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能する DNA。

[2] 以下の(A)～(C)のいずれかの DNA を含む病原菌応答性プロモータ、

(A) : 配列番号 2 で示される塩基配列からなる DNA、

(B) : 配列番号 2 で示される塩基配列において 1 若しくは複数の塩基が置換、欠失、挿入、又は付加された塩基配列からなり、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能する DNA、

(C) : (A)又は(B)の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能する DNA。

[3] 以下の(1)～(3)のいずれかの DNA を含む病原菌応答性プロモータ、

(1) : 配列番号 1 で示される塩基配列内の連続した一部分からなり、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能する DNA、

(2) : (1)の DNA において 1 若しくは複数の塩基が置換、欠失、挿入、又は付加された塩基配列からなり、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能する DNA、

(3) : (1)又は(2)の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能する DNA。

[4] 以下の(i)～(iii)のいずれかの DNA を含む病原菌応答性プロモータ、

(i) : 配列番号 22 で示される塩基配列からなる DNA、

(ii): 配列番号 22 で示される塩基配列において 1 若しくは複数の塩基が置換、  
欠失、挿入、又は付加された塩基配列からなり、植物細胞内で病原菌応答性プロ  
モータとして機能する DNA、

- (iii): (i)又は(ii)の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、  
5 植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能する DNA。

[5] 以下の(i)～(iii)のいずれかの DNA を含み、植物細胞内で病原菌応答性  
プロモータとして機能する病原菌応答性プロモータ、

(i): 配列番号 23 で示される塩基配列からなる DNA、

- (ii): 配列番号 23 で示される塩基配列において 1 若しくは複数の塩基が置換、  
10 欠失、挿入、又は付加された塩基配列からなる DNA、

(iii): (i)又は(ii)の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする  
DNA。

[6] 疫病菌の感染に対して特異的に応答する、ことを特徴とする[1]～[5]  
のいずれかに記載の病原菌応答性プロモータ。

- 15 [7] 配列番号 23 で示される塩基配列からなる DNA。

[8] 配列番号 23 で示される塩基配列の中の連続する 10 個以上の塩基配列  
からなり、病原菌応答性プロモータ活性を有する DNA。

[9] [1]～[6]のいずれかに記載の病原菌応答性プロモータを含むベクター。

[10] [7]又は[8]に記載の DNA を含むベクター。

- 20 [11] [1]～[6]のいずれかに記載のプロモータと、及び該プロモータの制  
御下に連結される遺伝子であって、植物内で発現して該植物の防御応答を活性化  
する遺伝子と、を含む DNA コンストラクト。

- [12] [7]又は[8]に記載の DNA と、該 DNA と協同して病原菌応答性プロモ  
ータを構成する DNA と、構築された病原菌応答性プロモータの制御下に連結され  
25 る遺伝子であって、植物内で発現して該植物の防御応答を活性化する遺伝子と、

を含む DNA コンストラクト。

[1 3] 前記遺伝子はその発現産物が植物の防御応答を制御する情報伝達経路を活性化する機能を有する、[1 1]又は[1 2]に記載の DNA コンストラクト。

5 [1 4] 前記遺伝子はその発現産物が SIPK 又は WIPK を活性化する機能を有する、[1 1]又は[1 2]に記載の DNA コンストラクト。

[1 5] 前記遺伝子は、恒常的活性型 MEK をコードする遺伝子である、[1 1]又は[1 2]に記載の DNA コンストラクト。

[1 6] [1 1]～[1 5]のいずれかに記載の DNA コンストラクトで宿主植物を形質転換して得られた形質転換体。

10 [1 7] 前記宿主植物がナス科に属する植物である、[1 6]に記載の形質転換体。

[1 8] 前記宿主植物がジャガイモ属に属する植物である、[1 6]に記載の形質転換体。

[1 9] 以下のステップを含む、形質転換植物の作出方法、

15 [1 1]～[1 5]のいずれかに記載の DNA コンストラクトで宿主植物を形質転換するステップ。

[2 0] 以下のステップを含む、宿主植物に病原菌耐性を付与する方法、

[1 1]～[1 5]のいずれかに記載の DNA コンストラクトで宿主植物を形質転換するステップ。

20 [2 1] [1]～[6]のいずれかに記載の病原菌応答性プロモータが外来的に導入されている植物。

[2 2] [7]又は[8]に記載の DNA が外来的に導入されている植物。

本発明において「病原菌応答性プロモータ」とは、病原菌の感染に対して応答する（誘導される）プロモータを意味する。ここで「プロモータ」とは、その制御下

25

にある遺伝子の転写の開始を調節する機能領域のことをいう。

本発明において「外来的に導入された」とは、外部から導入されたものであることを意味する。したがって「外来的に導入されたプロモータ」とは、宿主細胞に対して外部から導入されたプロモータのことであり、例えば導入するプロモータと  
5 同一のプロモータを宿主細胞が初めから保有していた場合には、同一の構成ではあるが導入されたプロモータのみを外来的に導入されたプロモータと呼び両者を区別する。

本発明において用語「DNA を含む」は、「DNA からなる」の意味をも含む表現として使用される。したがって例えば、「特定の DNA を含むプロモータ」といった場合には、それが意味するものとして「当該 DNA からなるプロモータ」も当然に考慮され  
10 る。

本明細書において使用される各略号の意味は次の通りとする。ATP: adenosine 5' -triphosphate、BPB: bromophenol blue、BSA: bovine serum albumin、CBB: coomassie brilliant blue、CTP: cytidine 5' -triphosphate、DEPC: diethylp  
15 yrocarbonate、DTT: dithiothreitol、EDTA: ethylenediamine-N, N, N' , N' - tetraacetic acid、EGTA: ethyleneglycol bis (B-amonoethylether) ethylened iamine-tetraacetic acid、FPP: farnesyl diphosphate、GAP: glyceraldehyde 3-phosphate、GTP: guanosine 5' -triphosphate、HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A、HMGR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reducta  
20 se、HWC: hyphal wall components、Ig: immunoglobulin、IPP: isopentenyl dip hosphate、IPTG: isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-thiogalactoside、kD: kilodalton、M OPS: 3- (N-morpholino) propanesulfonic acid、PAGE: polyacrylamide gel el ectrophoresis、PBS: phosphate-buffered saline、PCR: polymerase chain rea ction、PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride、PR: pathogenesis related、SD  
25 S: sodium dodesyl sulfate、SHAM: salicylhydroxamic acid、SSPE: sodium ch

rolide-sodium phosphate, EDTA, TBE: tris-borate, EDTA, TBS: tris-buffered saline, TE: tris-EDTA, Tris: 2-N-tris (hydroxymethyl) aminomethane, TTP: thiamine 5'-triphosphate, X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside.

5      尚、特に記載のない限り、以下における遺伝子工学的操作は、Molecular Cloning (Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) 或いは Current protocols in molecular biology (edited by Frederick M. Ausubel et al., 1987) を参考にして行うことができる。

10      本発明によれば、病原菌の感染によって誘導されるプロモータが提供される。本発明のプロモータを利用して遺伝子導入を行えば、形質転換植物内において所望の遺伝子を病原菌の感染時特異的に発現させることが可能となる。従って、例えば防御応答に関与する遺伝子を用いることにより、病原菌の感染時において迅速な防御応答が行われる病原菌耐性植物の作出が可能となる。

15

#### 図面の簡単な説明

図 1 はジャガイモ塊茎における、刺激応答性イソプレノイドの生合成経路を示す図である。過敏反応中はセスキテルペイドファイトアレキシン合成が活発に行われ、傷害誘導性ステロール及びステロイド・グリコアルカロイド合成は抑制さ  
20      れる。

図 2 は疫病菌 (*Phytophthora infestans*) 感染後における、加齢ジャガイモディスク内の PVS (potato vetispiradiene synthase) 遺伝子及び PSS (potato squalene synthase) 遺伝子の発現状態を示す図である。レース 0 (非親和性)、若しくはレース 1、2、3、4 (親和性) の感染 ( $10^4$  遊走子/ディスク)、又は水処理  
25      に先立ちジャガイモディスクを 24 時間加齢させた。



図 3 は非親和性疫病菌 (*P. infestans*) 若しくは親和性疫病菌の感染後 (順に Incomp.、Comp.)、又は水処理後 (Mock) の加齢ジャガイモディスクから抽出した全 RNA を使用した RT-PCR の結果を示す図である。PVS1、PVS2、PVS3、及び PVS4 についてそれぞれクローン特異的プライマーを用いて PCR を行った。PVS1、PVS2、  
5 PVS3、及び PVS4 についてそれぞれ 469bp、132bp、326bp、及び 469bp の増幅産物が得られた。

図 4 は非親和性疫病菌 (*P. infestans*) 若しくは親和性疫病菌の感染後 (順に Incomp.、Comp.)、又は水処理後 (Mock) 後の加齢ジャガイモディスクから抽出した全タンパク質を用いたウエスタンブロット解析の結果を示す図である。SDS-ポ  
10 リアクリルアミドゲル電気泳動によって各 10  $\mu$ g の全タンパク質を分離し、PVS に対する抗血清を用いて免疫ブロットを行った。検出には HRP 結合抗マウス抗体及び ECL 検出キットを使用した。

図 5 は水処理後 (Mock)、傷害処理後 (Wound)、又は非親和性疫病菌 (*P. infestans*) 若しくは親和性疫病菌の感染後 (順に Incomp.、Comp.) のジャガイモ葉  
15 から抽出した全 RNA を用いた RT-PCR の結果を示す図である。レーン T1: 非親和性疫病菌の感染後 6 時間経過させたジャガイモ塊茎から得られた RT-PCR 産物を用いたポジティブコントロール。各メンバー (PVS1、PVS2、PVS3、及び PVS4) に特異的なプライマーを使用した。その結果、176bp、132bp、326bp、及び 131bp の産物がそれぞれ得られた。アガロースゲル電気泳動によって RT-PCR 産物を分離  
20 し、ナイロン膜に転写した。転写後の膜に対して  $^{32}$ P ラベルした各 PCR 産物をハイブリダイズさせた。

図 6 は PVS3 ゲノムクロンの塩基配列及び推定アミノ配列を示す図である。尚、図 6 では推定プロモータ領域及びコード領域の一部が示される。アミノ酸配列はそれをコードする塩基の下に表示されている。非コード領域は小文字で表される。  
25 終止コドンはアスタリスクで示される。

図 7 は同じく PVS3 ゲノムクローンの塩基配列及び推定アミノ配列を示す図である。尚、図 7 ではコード領域の一部及びそれに続く非翻訳領域が示される。アミノ酸配列はそれをコードする塩基の下に表示されている。非コード領域は小文字で表される。終止コドンはアスタリスクで示される。

- 5 図 8 は PVS3 ゲノムクローン及び PVS3cDNA クローンの制限酵素地図及び構造地図を示す図である。コード領域は中抜きボックスで表される。太線はイントロンを表す。垂直バーはイントロン位置に対応する。

- 図 9 は *Nicotiana tabacum* (TEAS)、*Solanum tuberosum* (PVS)、*Hyoscyamus muticus* (HVS)、及び *Capsium annuum* (PEAS) のアミノ酸配列の配置を比較して示した模式図である。各エクソンに対応する推定アミノ酸を使用した。太字の垂直バーは、*N. tabacum* 遺伝子内、*S. tuberosum* 遺伝子内、*H. muticus* 遺伝子内、及び *C. annuum* 遺伝子内のイントロン位置を示す。ボックス内の数字はエクソンによってコードされるアミノ酸残基数を示す。パーセント表示は比較されるドメイン間の相同性スコアを示し、H、C、及び DDXXD (又は DDXX) はヒスチジン、システイン、及びアスパラギン酸に富む (基質結合部位として知られる) 保存残基を示す。
- 10
- 15

- 図 10 は疫病菌菌体壁成分による処理後、又は水処理後のジャガイモプロトプラスト内のルシフェラーゼ活性を測定した結果である。(A) は PVS3 プロモータ領域を用いたトランジェントアッセイに使用した Luc 遺伝子の構成を示す。(B) において、35S は CaMV 35S プロモータ領域を用いた場合のルシフェラーゼ活性を、HWC は推定プロモータ領域を用い HWC で処理した場合のルシフェラーゼ活性を、Water は HWC の代わりに水で処理した場合のルシフェラーゼ活性をそれぞれ表す。
- 20

図 11 は PVS3 プロモータのコンストラクトを模式的に示す図である。GUS はレポーター遺伝子である。

- 25 図 12 は傷害に応答して PVS3 プロモータが誘導する GUS の発現パターンを示す

図である。PVS3 プロモータを有する形質転換ジャガイモ葉組織を使用した。

図 1 3 は疫病菌感染に応答した、PVS3 プロモータの発現パターンを示す図である。形質転換ジャガイモ葉組織（メークイン）又は染色対照区として非形質転換ジャガイモ葉組織（リシリ）をレース 0 に感染させた（メークインに対して親和性、リシリに対しては非親和性）。感染後 6 時間、12 時間、24 時間、及び 48 時間経過した時点での GUS 活性を、GUS 染色溶液を用いて検出した。顕微鏡下で観察を行った。

図 1 4 は形質転換ジャガイモ植物における、PVS3 プロモータが誘導する GUS の発現パターンを示す図である。GUS 染色溶液を用いて形質転換ジャガイモ植物の GUS 活性を検出した。矢印は疫病菌感染領域（GUS 染色のコントロール）を示す。

図 1 5 はアラキドン酸（AA）に応答して PVS3 プロモータが誘導する GUS の発現パターンを示す図である。AA（5 mM）又は水を形質転換ジャガイモ葉組織に注入した。注入後 6 時間、12 時間、及び 24 時間経過した時点での GUS 活性を GUS 染色溶液を用いて検出した。

図 1 6 は  $H_2O_2$  に応答して PVS3 プロモータが誘導する GUS の発現パターンを示す図である。 $H_2O_2$ （5 mM）を形質転換ジャガイモ葉組織に注入した。注入後 6 時間、12 時間、24 時間、及び 48 時間経過した時点での GUS 活性を GUS 染色溶液を用いて検出した。

図 1 7 はグルコース／グルコースオキシダーゼに応答して PVS3 プロモータが誘導する GUS の発現パターンを示す図である。グルコース（5 mM）及びグルコースオキシダーゼ（0.5 U/ml）を形質転換ジャガイモ葉組織に注入した。注入後 6 時間、12 時間、24 時間、及び 48 時間経過した時点での GUS 活性を、GUS 染色溶液を用いて検出した。

図 1 8 はサリチル酸（SA）に応答して PVS3 プロモータが誘導する GUS の発現パターンを示す図である。SA（0.5 mM）を形質転換ジャガイモ葉組織に注入した。

注入後 6 時間、12 時間、24 時間、及び 48 時間経過した時点での GUS 活性を GUS 染色溶液を用いて検出した。

図 19 は Cf-9/Avr9 相互作用又は StMEK<sup>DD</sup> に応答して PVS3 プロモータが誘導する GUS の発現パターンを示す図である。35s、Cf-9/Avr9、StMEK<sup>DD</sup>、あるいは空ベクター（コントロール）を保有するアグロバクテリウムを形質転換ジャガイモ葉組織に接種した。アグロバクテリウム接種後 2 日経過した時点での GUS 活性を、GUS 染色溶液を用いて検出した。

図 20 はエリシター誘導シグナル伝達経路を模式的に示した図である。MAPKKK; mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MAPKK; mitogen-activated protein kinase kinase, MAPK; mitogen-activated protein kinase, SIPK; salicylic acid-induced protein kinase, WIPK; wound-induced protein kinase, HMG R; 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase, PVS; potato virus Y RNA replicase

図 21 はジャガイモ植物の MEK 遺伝子 (MEK) のコード領域の配列及びそれによってコードされる推定アミノ酸配列を示す図である。

図 22 は恒常的活性型 MEK 遺伝子 (StMEK<sup>DD</sup>) のコード領域の配列及びそれによってコードされる推定アミノ酸配列を示す図である。

図 23 は実施例において使用されるプライマー配列の位置を示す図である。尚、各プライマー位置を示す矢印とともに記載される番号は配列番号を表す（例えば P9 であれば配列番号 9 の配列を有するプライマー）。実施例 2 においては P9、P10、P11、P14、P15、P16、P17、及び P18 を用いた。他方、実施例 4 においては P11、P12、P13、P14、P15、P16、P19、及び P20 を用いた。

図 24 は pPVS3-1 から pPVS3-10 のデリーションクローンの構築に使用したプライマー配列を示す。F はフォワードプライマー、R はリバースプライマーを示し、下線は制限酵素の位置を示す。

図 2 5 はトランジェントアッセイに使用した PVS プロモータ領域を含むバイナリーベクターの構造を示す。GUS 遺伝子はイントロンを含んでいる。

図 2 6 は INF1 処理または StMEK1<sup>DD</sup> 発現に対する PVS3 プロモータ活性を調べる方法を示す。INF1 の場合は PVS3 : GUSint を保持したアグロバクテリウムを葉に  
5 注入し、StMEK1<sup>DD</sup> の場合は PVS3 : GUSint と XVE : StMEK1<sup>DD</sup> を保持したアグロバクテリウムの混合液を葉に注入して 1 日間静置する (A)。その後、INF1 の場合は INF1 溶液を葉に注入し、StMEK1<sup>DD</sup> の場合は  $\beta$ -エストラジオールを注入した後 (B) さらに 1 日静置して StMEK1<sup>DD</sup> を発現させて GUS 活性を調べた (C)。

図 2 7 はウイルス誘導型遺伝子サイレンシングの手順を示す。(A) はサイレン  
10 シングベクターである pGR106 の構造を示す。サイレンシングする目的の遺伝子断片、この場合は SIPK および WIPK の cDNA 断片を pGR106 に挿入して用いる。(B) はベクターを含むアグロバクテリウムの接種によるウイルス感染を示した模式図である。

図 2 8 は、INF1 処理に対する PVS3 プロモータ活性を示す。-1337 (pPVS3-2)  
15 では対照区に比べて INF1 を注入すると GUS 活性が誘導された。一方、-1287 (pPVS3-3)まで PVS3 プロモータをデリーションすると INF1 処理による GUS 活性誘導は顕著に減少した。

図 2 9 は PVS3 プロモータの塩基配列および pPVS3-1 から pPVS3-10 までのデリー  
20 ーション位置を示す。シス配列が存在すると思われる-1337 と-1287 の間の配列を太字で示し、推定上の TATA ボックスおよび CAAT ボックスを四角で囲んだ。

図 3 0 は StMEK1<sup>DD</sup> 発現に応答する PVS3 プロモータ活性を示す。-1337 (pPVS3-2)では対照区に比べて  $\beta$ -エストラジオールを注入すると GUS 活性が誘導された。一方、-1287 (pPVS3-3) まで PVS3 プロモータをデリーションすると  $\beta$ -エストラジオール処理による GUS 活性誘導は顕著に減少した。

25 図 3 1 は、StMEK1<sup>DD</sup> 発現で誘導される PVS3 プロモータ活性に及ぼす WIPK また

は SIPK の影響を調べる方法を示す。PVS3 : GUSint と XVE : StMEK1<sup>DD</sup> を保持したアグロバクテリウムの混合液をサイレンシング葉に注入して 1 日間静置する (A)。β-エストラジオールを注入した後 (B)、さらに 1 日静置して StMEK1<sup>DD</sup> を発現させて GUS 活性を調べた (C)。

- 5 図 3 2 は StMEK1<sup>DD</sup> 発現で誘導される PVS3 プロモータ活性および TEAS 遺伝子発現に及ぼす WIPK または SIPK の影響を示す。WIPK または SIPK をサイレンシングすると、StMEK1<sup>DD</sup> 誘導による PVS3 プロモータ活性が著しく抑制された (A)。さらに、全 RNA を抽出してノーザン解析したところ、WIPK および SIPK をサイレンシングした区においてのみベンサミアナのセスキテルペンシクラーゼ遺伝子発現が
- 10 抑制されていた (B)。

発明を実施するための最良の形態

(プロモータ)

- 本発明の第 1 の局面は病原菌応答性プロモータに関し、その一態様は配列番号
- 15 1 で示される塩基配列からなる DNA を含んで構成される。当該 DNA は、後述の実施例に説明されるように、ジャガイモ PVS3 遺伝子のプロモータ領域として同定された配列であって、病原菌の一種である疫病菌特異的な応答性が認められている。更なる検討の結果、当該 DNA の上流域を欠失した約 1,300bp からなる DNA (配列番号 2 2) であっても目的のプロモータ活性を保持していることが確認された。
- 20 かかる知見を考慮すれば、本発明の好ましい一態様は、配列番号 2 2 で示される塩基配列からなる DNA を含む病原菌特異的プロモータである。一方、この DNA 配列 (配列番号 2 2) の上流域 50bp (配列番号 2 3) をさらに欠失させたところプロモータ活性の劇的な低下が認められた。このことから、この欠失させた 50bp (配列番号 2 3) が、当該プロモータ活性の発揮にとって極めて重要な領域、即ち PV
- 25 S3 遺伝子プロモータのシス配列を含む領域であると予想される。したがって、当

該領域（以下、「第 1 DNA 配列」ともいう）は病原菌応答性プロモータの構築に極めて有用であり、また、当該領域を用いることにより病原菌応答性プロモータを組み込んだ DNA コンストラクト（例えば、植物に対して病原菌耐性を付与することに利用される組み換えベクター。詳しくは後述の DNA コンストラクトの項を参照されたい。）の設計及び構築を高い自由度で行うことが可能となる。このように本発明は他の態様として病原菌応答性プロモータの構築に有用な DNA 配列を提供する。ここで、一般にシス配列は十数塩基の配列からなる場合が多いことを考慮すれば、第 1 DNA 配列の一部がシス配列であると考えられる。このことは、第 1 DNA 配列の一部の領域からなる DNA であってもそれがシス配列を含む場合には、病原菌応答性プロモータの構築に有用な DNA となることを意味する。このような DNA として想定されるものは例えば、第 1 DNA 配列中の連続する 10 個以上の塩基配列、好ましくは連続する 15 個以上の塩基配列、更に好ましくは連続する 20 個以上の塩基配列からなる DNA である。

第 1 DNA 配列（若しくはその連続する一部、又は後述するようにその機能が保持される条件で第 1 DNA 配列若しくはその連続する一部に所望の改変を加えて得られる DNA(改変体))を用いる場合、他の DNA 配列を組み合わせることによって、病原菌応答性プロモータを構築することができる。ここでの他の DNA 配列は、第 1 DNA 配列（又はその改変体）と協同することによって病原菌応答性プロモータを構築できるものが使用される。具体的には例えば他の DNA 配列として配列番号 24 に示されるものを使用することができる。当該 DNA 配列は PVS3 遺伝子において第 1 DNA 配列とコード領域とに挟まれる領域の DNA 配列である（図 29 を参照）。この領域には CAAT ボックスや TATA ボックスが存在し、またこの領域を用いることにより本来の PVS3 プロモータ領域が構築されることとなることから、このような態様によれば高いプロモータ活性を有する病原菌応答性プロモータが得られる

こととなる。尚、この例に限らず、CAAT ボックスや TATA ボックスなどを含む DNA 配列を採用すれば、これら転写開始又は転写調節に関与する配列との協同作用による良好なプロモータ機能の発揮を期待できる。尚、ここでの他の DNA 配列は、第 1 DNA 配列に直接又は他の配列を介して連結される。

5

ここに「病原菌」とは、植物に感染して被害を与える菌類のことをいい、疫病菌をはじめとする病原糸状菌は勿論のこと病原性細菌が含まれる。ここに「疫病菌」とは *Phytophthora* 属に属する菌類であって、感染対象の植物ごとに分類されている。疫病菌の具体例としては、ジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*)、タバコ疫病菌 (*Phytophthora nicotianae*)、ダイズ茎疫病菌 (*Phytophthora megasperma* var. *sojae*) リンゴ疫病菌 (*Phytophthora cactorum* 及び *Phytophthora c*  
10 *ambivora*) を挙げることができる。一方、疫病菌以外の病原糸状菌としては、ジャガイモ菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*)、ダイズさび病菌 (*Phakopsora pachyrhizi*) を例示することができる。また、病原性細菌としてはトマト青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*、細菌) を例  
15 示することができる。

ここで、本発明のプロモータ（病原菌応答性プロモータの構築に有用な DNA を含む。特に言及のない限り、以下においても同様である。）は病原菌の感染に対して特異的な応答性を有することが好ましい。ここでの「特異的な」とは、特異性が  
20 高いことを意味する。したがって、本発明のプロモータは病原菌の感染に対して高い特異性を有するもの、即ち、病原菌の感染に対する応答性を有し且つ病原菌の感染以外の病害に対する応答性が実質的にないプロモータであることが好ましい。

25 (プロモータの取得方法)



本発明のプロモータは、例えば、ダンシャク (*Solanum tuberosum* L.) などのジャガイモ植物から常法でゲノム DNA を抽出した後、本発明のプロモータに特異的なプライマーを用いた PCR 法等の遺伝子増幅反応を利用して調製することができる。具体的には例えば次の手順で本発明のプロモータを調製することができる。

- 5 まず、採取した後に凍結処理したジャガイモ植物の葉又は塊茎を乳鉢中で磨碎する。次に、適当量の抽出用緩衝液（例えば SDS 含有 Tris-HCl 緩衝液）を加えて抽出液とする。続いて、フェノール抽出、エタノール沈殿等によってゲノム DNA の抽出、精製を行う。このようにして得られたゲノム DNA を鋳型として配列番号 1
- 10 のプロモータに特異的なプライマーを用いた PCR 法を実施することにより、目的の DNA（プロモータ）が増幅産物として得られる。プライマーとしては例えば、次の配列を有する一対のプライマーを使用することができる。

センスプライマー：TTGTCTGCTGCTGCTTGTGG（配列番号 1 5）

アンチセンスプライマー：TCTCCATGAGTCCTTACATG（配列番号 1 6）

- 15 プライマーは、目的の DNA を特異的に増幅できるように設計される。以下に、配列番号 2 2 の DNA を特異的に増幅可能なプライマーセットを示す。

センスプライマー：CGGAATTCGTCCGCCCTTACTATTCCCATC（配列番号 2 6）

- アンチセンスプライマー：CCATCGATTCTCTTCATTGTTAAAGGGGA（配
- 20 列番号 3 5）

- 本発明のプロモータの調製方法は上記のものに限定されるものではなく、例えば市販のジャガイモゲノムライブラリー（例えば、ジャガイモ品種 Desiree ゲノムライブラリー（Clontech））を利用して調製することもできる。このようなジャ
- 25 ガイモゲノムライブラリーから目的のプロモータを単離するには、ライブラリー

の種類に応じてブランクハイブリダイゼーション法あるいはコロニーハイブリダイゼーション法などが利用される (Molecular Cloning, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 等を参照)。例えばファージを用いて構築されたライブラリーの場合を例に採ればブランクハイブリダイゼーション法が利用される。目的のプロモータ領域を保有するクローンの選択には、本発明のプロモータに特異的な配列を有するプローブが用いられる。

目的とするクローンが選択されれば、このクローンが保有する DNA を鋳型とし、配列番号 1 の配列に特異的なプライマーを用いた PCR 法等を実施することにより、本発明のプロモータを増幅産物として得ることができる。

10 得られたクローンが保有する DNA を適当なベクターにサブクロニングして以降の利用に供することができる。これによって例えば、形質転換用の組換えベクターの構築 (後述の本発明の第 2 の局面を参照) や、或は塩基配列解読に適したプラスミドの構築ができる。

本発明のプロモータの調製方法は上記のものに限られるものではなく、例えば市販の DNA 合成機などを利用して本発明のプロモータを合成してもよい。

#### (改変プロモータ)

配列番号 1 の配列はおよそ 2600 bp であってプロモータ領域としてはかなり大きいことから、プロモータ活性に直接関与しているのは一部の領域であると予想される。このことを考慮して、配列番号 1 の配列内の連続した一部からなる領域であっても病原菌応答性プロモータとしての機能が認められれば、本発明における病原菌応答性プロモータを構成し得る。さらに、一般にプロモータの機能領域は構造遺伝子の直前に位置することが多いことを考慮すれば、例えば、図 6 及び 7 に示される PVS3 遺伝子の配列において -2000 位 ~ -1 位の塩基からなる領域 (配列番号 2)、好ましくは同様に -1500 位 ~ -1 位の塩基からなる領域 (配列番号 3)、

更に好ましくは同様に-1000 位~-1 位の塩基からなる領域（配列番号 4）が機能領域の有力な候補となる。実際のところ、後述の実施例に示すように、構造遺伝子の直前に位置する約 1300bp の領域（配列番号 2 2）を使用した場合においてもプロモータ活性を有することが確認された。一方でこの約 1300bp の領域の上流域  
5 50bp（配列番号 2 3）をさらに欠失させたところプロモータ活性の劇的な低下が認められた。即ち、PVS3 プロモータの機能領域の少なくとも一つはこの 50bp 内に存在することが判明した。この事実を考慮すれば、本発明のプロモータでは、配列番号 2 3 に示される配列を含むことが好ましい。このようなプロモータの具体例としては、配列番号 2 2 に示される DNA（PVS3 遺伝子の-1337 位~-1 位）を  
10 挙げることができる。

一方で、一般に、特定の機能を有する DNA の一部に改変を施した場合においてもその機能が維持されることがある。このことを考慮して、以上の本発明のプロモータを構成する DNA（即ち、配列番号 1 で示される DNA、或は上記の機能領域（配  
15 列番号 2 3）を含む DNA（例えば配列番号 2 2 で示される DNA）の一部を改変した塩基配列を有する DNA（以下、「改変 DNA」ともいう）であっても、病原菌応答性プロモータとしての機能を有する限りにおいて本発明の病原菌応答性プロモータを構成することができる。別に言えば、病原菌応答性プロモータ機能を維持する限りにおいて一部の配列の改変が許容される。ここでの「一部の改変」とは、典型  
20 的には、配列番号 1（又は配列番号 2～4 のいずれか）に示される塩基配列、又は配列番号 2 2 に示される塩基配列において 1 若しくは複数の塩基が置換、欠失、挿入、又は付加されることをいう。このような改変は複数の部位に生じていてもよい。ここでの「複数」とは改変が行われる位置や改変の種類によっても異なるが例えば 2～100 個、好ましくは 2～50 個、より好ましくは 2～10 個であ  
25 る。以上のような改変 DNA は例えば、制限酵素処理、エキソヌクレアーゼや DNA

リガーゼ等による処理、位置指定突然変異導入法 (Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) やランダム突然変異導入法 (Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) による変異の導入などによって得られる。

配列番号 1 (又は配列番号 2 ~ 4 のいずれか) の配列を有する DNA、或いは配列番号 2 の配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能する DNA を本発明のプロモータを構成する DNA として用いることもできる。また、配列番号 1 の配列に上記一部の改変を加えて得られる配列 (又は配列番号 2 ~ 4 のいずれかの配列に上記一部の改変を加えて得られる配列) を有する DNA、或いは配列番号 2 の配列に上記一部の改変を加えて得られる配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能する DNA を用いることもできる。ここでいう「ストリンジェントな条件」とはいわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。ストリンジェントな条件は配列の長さや構成塩基の種類によっても変動するが、例えば、ハイブリダイゼーション液 (50%ホルムアルデヒド、10×SSC (0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0)、5×Denhardt 溶液、1% SDS、10% デキストラン硫酸、10 µg/ml の変性サケ精子 DNA、50mM リン酸バッファー (pH7.5)) を用いて 42°C でインキュベーションし、その後 0.1×SSC、0.1% SDS を用いて 68°C で洗浄する条件である。更に好ましいストリンジェントな条件としては、ハイブリダイゼーション液として 50%ホルムアルデヒド、5×SSC (0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0)、1×Denhardt 溶液、1% SDS、10% デキストラン硫酸、10 µg/ml の変性サケ精子 DNA、50mM リン酸バッファー (pH7.5)) を用いる条件を例示す

ることができる。

#### (DNA コンストラクト)

本発明のプロモータの制御下に、それが発現することにより植物の防御応答を  
5 活性化する遺伝子（導入遺伝子）を連結することにより、植物に対して病原菌耐  
性を付与することに利用できる DNA コンストラクトが構築される。形質転換用の  
DNA コンストラクトとする場合には、本発明のプロモータ及び導入遺伝子が適当  
なベクター（プラスミド、バクテリオファージ、ウイルス等）に組込まれた状態  
にあることが好ましい。

10

#### (導入遺伝子)

導入遺伝子としては、それが導入された植物内で発現することにより当該植物  
の防御応答を活性化する機能を有するものが用いられる。例えば、植物の防御応  
答を制御する情報伝達経路を活性化する機能を有する遺伝子を導入遺伝子として  
15 採用することができる。このような遺伝子の具体例としては mitogen-activated  
protein(MAP)キナーゼの一種である SIPK(salicylic acid-induced protein kin  
ase) 又は WIPK(Wound-Induced Protein Kinase)を活性化する機能を有する M  
EK 遺伝子を挙げることができる。MEK 遺伝子の一例として、ジャガイモ植物の ME  
K 遺伝子(StMEK)のコード領域の配列(配列番号 5)及びそれによってコードさ  
20 れるアミノ酸配列(配列番号 6)を図 21 に示す。

恒常的活性型のタンパク質をコードする遺伝子を導入遺伝子として採用するこ  
とが特に好ましい。このような態様によれば、形質転換体内において、防御応答  
を活性化するタンパク質として初めから活性型のものが生成され、迅速かつ確実に  
防御反応が進行するからである。恒常的活性型のタンパク質をコードする遺伝  
25 子は、野生型のタンパク質をコードする遺伝子の配列を基にして、それがコード

するアミノ酸配列の一部が変異するように一部の改変を施すことにより作製することができる。尚、ジャガイモ植物においては MEK を改変した恒常的活性型 MEK (StMEK<sup>00</sup>) が作製されており、本発明においてこの StMEK<sup>00</sup> をコードする遺伝子を導入遺伝子として利用することもできる。尚、StMEK<sup>00</sup> 遺伝子のコード領域の配  
5 列（配列番号 7）及びそれによってコードされるアミノ酸配列（配列番号 8）を図 2 2 に示す。

ここで、上記における「防御応答」の種類は特に限定されず例えば、ファイトアレキシンの生成、PR (Pathogenesis-Related) タンパク質の発現、活性酸素の生成、パピラ形成、リグニン化などが該当する。

10

（ベクター）

以上のような DNA コンストラクトの構築に利用されるベクターとしては、本発明のプロモータ及びその制御下に配置される導入遺伝子をターゲット細胞（宿主細胞）に導入することができ且つターゲット細胞内で導入遺伝子を発現させるこ  
15 とができるものであれば特に限定されず、目的に応じて適当なプラスミドベクター、入ファージベクターなどが利用される。後述するアグロバクテリウムを利用した形質転換に使用するベクターを構築する場合には例えば T-DNA 境界配列を有する Ti プラスミドベクター、Ti プラスミドバイナリベクターを利用することができる。他方、アグロバクテリウムの介在を必要としない形質転換方法（エレクトロポレーション法、パーティクルガン法など）に使用する場合には、各種 pUC  
20 系プラスミドベクター、各種入ファージベクター（ZAPII 等）などを利用して組換えベクターを構築することができる。数多くのベクターが市販されており、本発明ではそれらの中から目的に応じて適切なものを選択して用いることができる。

尚、まず本発明のプロモータを含有するベクターを構築し、その後導入遺伝子  
25 の連結を行ってもよい。即ち、所望の導入遺伝子を挿入可能な汎用性の高いベク

ターを構築しておき、これを利用して形質転換用の組換えベクターを作製してもよい。

形質転換用の組換えベクターには、典型的には、本発明のプロモータの他に導入遺伝子及び適当なターミネータが含有される。プロモータによる導入遺伝子の適切な転写が達成されるように、上流から下流に向かって順にプロモータ、導入遺伝子、及びターミネータが配置される。組換えベクター内に、選択マーカーやエンハンサー機能を有する配列、シグナルペプチドをコードする配列などを含有させてもよい。

10

#### (ターミネータ)

ターミネータとは mRNA の合成を終了させる信号として認識される配列である。植物細胞内で適切に機能するターミネータが使用される。例えば Nos ターミネータを使用することができる。

15

#### (選択マーカー)

選択マーカーは、形質転換した細胞、組織、カルスなどを識別あるいは選択するために使用される。各種の選択マーカーが周知であって例えば、カナマイシン等に対する抵抗性を付与する npt 遺伝子 (Herrera Estrella, EMBO J. 2 (1983), 987-995) や nptII 遺伝子 (Messing & Vierra, Gene 19:259-268 (1982))、ハイグロマイシンに対する抵抗性を付与する hph 遺伝子 (Blochinger & Diggl mann, Mol Cell Bio 4:2929-2931)、メタトレキセートに対する抵抗性を付与する dhfr 遺伝子 (Bourouis et al., EMBO J. 2(7))、 $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子、GFP 遺伝子 (Gerdes, FEBS Lett. 389 (1996), 44-47)、ルシフェラーゼ (Giacomini, P1. Sci. 116 (1996), 59~72; Scikantha, J. Bact. 178 (1996), 121) など

25

を、使用するベクター宿主系や使用目的などに応じて適宜選択して用いることができる。

ベクターへのプロモータや導入遺伝子などの挿入は、制限酵素及び DNA リガー  
5    ゼを用いた方法など、常法に従い行うことができる（例えば、Molecular Clonin  
g, Third Edition, 1.84, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York を  
参照）。

（形質転換方法）

10    本発明の DNA コンストラクト又は組換えベクターを植物の形質転換に利用でき  
る。形質転換方法（遺伝子導入方法）としては、アグロバクテリウム利用した方  
法（アグロバクテリウム法）、ポリエチレングリコールを利用して遺伝子を導入す  
る方法、電氣的刺激を利用して遺伝子を導入する方法（エレクトロポレーション  
15    法）、及び遺伝子を結合させた金属粒子を植物組織（細胞）に打ち込む方法（パー  
ティクルガン法）などを用いることができる。各方法についての詳細については  
種々の文献や成書に記載があり、例えばアグロバクテリウム法については Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA 86(1989), 8467-8471 や Plant Mol. Biol. 20(1992), 96  
3-976 等を参照することができる。

尚、ジャガイモ植物を形質転換する場合には Jefferson (1987) の方法（文献  
20    19 を参照）を採用することもできる。

本発明のプロモータおよび導入遺伝子を含む DNA コンストラクトを導入して得  
られた形質転換体では、病原菌の感染によって導入したプロモータが誘導され、  
その結果その制御下にある導入遺伝子が発現する。従って、導入遺伝子として病  
25    原菌感染の防御に有効なものを採用すれば、病原菌に対して耐性のある植物（形



質転換体) が得られる。

形質転換の結果得られた植物細胞を用いて形質転換植物を再生することができる。このような再生方法は、植物の種類に応じて、常法に従い行うことができる。

## 5 (ターゲット植物)

本発明の DNA コンストラクト又は組換えベクターを用いた形質転換に供される植物(ターゲット植物)は特に限定されず、双子葉植物及び単子葉植物のいずれに属するものであってもよい。双子葉植物としては例えば、ナス科(ジャガイモ属、タバコ属、トマト属など)、バラ科(ウメ属、モモ属、リンゴ属など)、マメ科(ダイズ属、エンドウ属など)、アブラナ科(ダイコン属など)、ゴマ科などに分類される植物が挙げられ、一方単子葉植物としては例えば、イネ科(イネ属、コムギ属、ライムギ類、オオムギ類、ハトムギ属、トウモロコシ属、サトウキビ属など)、ユリ科(ネギ属、ニンニク属など)などに分類される植物が挙げられる。

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明する。

15

### [実施例]

以下の実施例 1 ~ 8 において使用される生物学的材料、試薬、実験方法等は次の通りである。

#### 1. 供試植物

20 ジャガイモ植物として、真正抵抗性遺伝子 R1 を持たない栽培品種ダンシャク(*Solanum tuberosum* L.)および真正抵抗性遺伝子 R1 を持つ品種リシリ(*Solanum tuberosum* L.と野生種 *S. demissum* L.との種間雑種)を使用した。品種ダンシャクは名古屋大学農学部附属農場で栽培し 7 月に収穫した塊茎、品種リシリは農林水産省北海道農業試験場の圃場で栽培し 10 月に収穫した塊茎を、いずれも 4℃ に保  
25 存し、供試した。形質転換植物を作製する際は、真正抵抗性遺伝子を持たないメ

ークインを用いた。

## 2. 供試菌

名古屋大学大学院生命農学研究科資源生物機能学講座植物病理学研究室において保存されているジャガイモ疫病菌 [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] レース 0 および レース 1, 2, 3, 4 を使用した。また、ジャガイモ疫病菌菌体壁成分 (HWC) エリシター調製に用いる菌として、同研究室で保存されているジャガイモ疫病菌 [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] レース 1, 2, 3, 4 を使用した。

10

## 3. 菌接種源の調製

ジャガイモ疫病菌の遊走子懸濁液は以下のように調製した。4℃に保存してあるジャガイモ（品種ダンシャク）塊茎を水道水でよく洗浄した後、1%次亜塩素酸ナトリウムに約 10 分間浸漬した。ジャガイモ塊茎をスライス（厚さ約 10 mm）し、水洗した後、約  $10^4$  孢子/ml に調整した遊走子懸濁液を塗布接種して 20℃の加湿暗下で 6 日間培養した。スライス表面に生育した菌をピンセットでかき取り、冷蒸留水（4℃）に懸濁した。孢子懸濁液を金属メッシュ（356 メッシュ）で濾過して菌糸を取り除き、濾紙 (ADVANTEC No. 5B) を用いて吸引濾過した。濾紙上に集められた遊走子嚢を冷蒸留水で洗った後、再び冷蒸留水に懸濁して 10℃で 2 時間静置した。遊走子懸濁液は、紫外可視分光解析システム（DU シリーズ 600、Beckman）を用いて吸光度を測定し、波長 500 nm における吸光度が 0.068 ( $10^5$  孢子/ml) となるように濃度調整した後、これを接種源として使用した。

15

20

## 4. 菌体壁成分エリシターの調製

Doke and Tomiyama, (1980) の方法（文献 14 を参照）に従い、疫病菌菌体壁成

25

分(HWC)を以下のように調製した。ジャガイモ疫病菌をライムギ培地 30 ml の入った 100 ml 三角フラスコ中で、20℃で2週間静置培養した。回収した菌体マットを水道水で洗浄した後、水分を吸引濾過により除去し、-80℃で凍結保存した。凍結菌体を乳鉢中で摩砕し、菌体重の5倍量の50 mM 酢酸緩衝液(pH 4.5)に懸濁した。

- 5 この懸濁液をソニケーター(W-225R Heat System-Ultrasonics Inc.)を用いて出力 45 W で5分間超音波処理した後、14,000 x g で30分間遠心分離した。得られた沈殿を先と等量の50 mM 酢酸緩衝液(pH 4.5)に懸濁し、再び先と同条件で超音波処理と遠心分離を行った。得られた沈殿をもとの菌体重と等量の0.1 M ホウ酸緩衝液(pH 8.8)に懸濁し、上記と同様な条件で超音波処理した後120℃で20分間
- 10 オートクレーブ処理し、14,000 x g で30分間遠心分離して上清を回収した。一方、沈殿は再び0.1 M ホウ酸緩衝液(pH 8.8)に懸濁し、超音波処理およびオートクレーブした後、遠心分離した。得られた上清を先の上清と合わせ、透析チューブ(排除限界分子量 12,000)を用い、水に対して4℃で24時間透析した。透析後の溶液に等量のジエチルエーテルを分液ロートを用いて混合し、静置した。エマ
- 15 ルジョン層を回収し、エバポレーターを用いてエーテルを減圧乾燥し、濃縮物に適量の水を加えて凍結乾燥した。得られた乾燥標品をHWCとして以下の実験に用いた。HWCの使用に際しては、ソニケーターを用いて出力 45 W で3分間超音波処理して水に懸濁した。

## 20 5. ジャガイモ塊茎ディスクの調製

- ジャガイモ塊茎ディスクは以下のように調製した。4℃に保存してあるジャガイモ(品種リシリ)塊茎を水道水でよく洗浄した後、1%次亜塩素酸ナトリウムに約10分間浸漬した。塊茎を茎軸方向にコルクボーラー(直径 20 mm)で打ち抜き、柔組織部より円柱状の組織カラムを作製した。このカラムより、ミクロトームを
- 25 用いて、厚さ 2 mm のディスクを調製した。調製したディスクは直ちに冷蒸留水(約

4℃) で洗浄した後、プラスチックチャンバーに並べ、加湿暗下に静置し、21 時間加齢した。尚、この作業は全て暗黒下で行った。

#### 6. HWC 処理および菌接種

- 5 上記 5. の方法に従って調製したジャガイモ塊茎ディスクを、1 枚につき 100  $\mu$ l ずつ蒸留水で前処理し、3 時間静置した。その後、各ディスクを 1 mg/ml HWC、または対照の 100  $\mu$ l 蒸留水で処理した。また、ジャガイモ疫病菌遊走子をディスクに接種する際には、遊走子濃度を均一に保つために、懸濁液 ( $10^5$  孢子/ml) を
- 10  $\mu$ l ずつ蒸留水で前処理し、3 時間静置した。その後、各葉組織へ遊走子濃度を均一に保つために、懸濁液を攪拌しながら 500  $\mu$ l 接種した。

処理および接種したディスク、葉組織は、さらに 20℃加湿暗下に静置し、所定時間静置した。処理後、静置したジャガイモ塊茎ディスク 3 枚を 1 組、葉組織 8 枚を 1 組にしてアルミホイルに包み、液体窒素中で凍結固定し、-80℃で保存した。

15

#### 7. ジャガイモ葉、または塊茎からの全 RNA 抽出

- 全 RNA 抽出は Yoshioka et al. (1996) の方法 (文献 5 2 を参照) で行った。
- ジャガイモ葉、または塊茎ディスク各 2 g を乳鉢中で液体窒素を加えながら磨砕し、5 ml 抽出緩衝液 [100 mM Tris-HCl (pH 9.0), 100 mM NaCl, 1 % SDS]、1
- 20 ml 2-メルカプトエタノール、2.5 ml 1 M トリス (pH 9.0) 飽和フェノール、2.5 ml クロロホルム・イソアミルアルコール (24:1; v/v)、のいった DEPC 処理済みの滅菌遠心管に入れ良く懸濁した後、遠心分離 (8,000 rpm、15 分間) した。回収した上清に対し 20 分の 1 量の 5 M 塩化ナトリウム、5 ml のイソプロパノールを加え、-20℃で 1 時間静置した。遠心分離 (8,000 rpm、15 分間) により得られた
- 25 沈殿を 5 ml グアニジニウム塩緩衝液 [4 M グアニジンチオシアネート、25 mM 酢

酸ナトリウム (pH 7.0)、0.5% N-ラウロイルサルコシン、20 mM 2-メルカプトエ  
タノール]、500  $\mu$ l 2M 酢酸ナトリウム (pH 4.0)、5 ml 水飽和フェノール、1 ml  
クロロホルム・イソアミルアルコール (49:1, v/v) を加え、良く懸濁し、遠心分  
離 (8,000 rpm、15 分間) した。回収した上清に 5 ml のイソプロパノールを加え、  
5 -20°C で 1 時間静置した。遠心分離 (8,000 rpm、15 分間) により得られた沈殿を  
300  $\mu$ l グアニジニウム塩緩衝液に懸濁し、等量のイソプロパノールを加え、-20°C  
で 1 時間静置した。遠心分離 (12,000 rpm、15 分間) により得られた沈殿を室温  
下で、500  $\mu$ l 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) で洗浄し、遠心分離 (12,000 rpm、15  
分間) した。この洗浄操作を 2 回繰り返す、さらに 500  $\mu$ l の 70% エタノールで  
10 洗浄し、遠心分離 (15,000 rpm、15 分間) した。得られた沈殿は真空乾燥後 100  
 $\mu$ l の DEPC 処理水に溶解し、これを全 RNA 試料とした。

#### 8. ノーザン解析

全 RNA をホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動 (文献 3 7 を参照) で分画し  
15 た後、アルカリブロットティング法 (文献 3 6 を参照) で Hybond-N+ ナイロン膜 (Amer  
sham) に転写・固定した。プローブに葉 PVS1 cDNA を用いた。

RNA を吸着させたナイロン膜を、42°C のプレハイブリダイゼーション溶液 [50%  
ホルムアミド、5 x デンハルト溶液 (文献 3 7 を参照)、5 x SSPE (文献 3 7 を参  
照)、0.5% SDS、100  $\mu$ g/ml 熱変性サケ精子 DNA (Pharmacia)] 中で 1 時間以上放置  
20 した後、<sup>32</sup>P 標識 DNA プローブを添加し、42°C 下で 16 時間以上ハイブリダイゼー  
ションを行った。この膜を 0.1% SDS 含有 4 x SSPE 中で室温下 15 分間 (2 回)、  
0.1% SDS 含有 4 x SSPE 中で 60°C 下 15 分間、さらに 0.1% SDS 含有 2 x SSPE  
中で 60°C 下 15 分間 (1 回) 順次洗浄した。オートラジオグラフィーは、X 線フィ  
ルム OMAT-AR (Kodak) および増感紙 Lighting Plus (Dupont) を用いて、-80°C 下で行  
25 った。

## 9. RT-PCR

RT-PCR は RT-PCR high-Plus (TOYOBO) を用いて行った。cDNA 合成には全 RNA 1.0  $\mu$ g、アンチセンスプライマー 10 pmol/ $\mu$ l およびアンチセンスプライマー 10 pmol/ $\mu$ l を用いて、94°C (1 分間)、47°C (1 分間) からなる増幅反応を 25 サイクル行った。使用したプライマーは以下のとおりであり、図 2 3 にそれぞれの cDNA にアニールする位置を示した。

PVS1: 5'-AGGAGATTGTTGCGCCCATATA-3' (配列番号 9) 及び 5'-TCTCCATGAGTCCTTACATG-3' (配列番号 10) (469 bp)、もしくは 5'-CATCGATTGTTTTGTACATCTG-3' (配列番号 11) 及び 5'-AATAATGATACAAAAAAATTAAGG-3' (配列番号 12) (176 bp)

PVS2: 5'-TATCAATTCACCAAGGAACACT-3' (配列番号 13) 及び 5'-GAAGTAATTAAATTAAATATTATCAA-3' (配列番号 14) (132 bp)

PVS3: 5'-TTGTCTGCTGCTGCTTGTGG-3' (配列番号 15) 及び 5'-TCTCCATGAGTCCTTACATG-3' (配列番号 16) (326 bp)

PVS4: 5'-AGGACATTGTTGACCTGTT-3' (配列番号 17) 及び 5'-TCTCCATGAGTCCTTACATG-3' (配列番号 18) (469 bp)、もしくは 5'-CATCCCTTAAAATTATAAGTATTC-3' (配列番号 19) 及び 5'-AATAATGATACAAAAATAAATTAAGG-3' (配列番号 20) (131 bp)

合成された cDNA を 2% アガロースゲル電気泳動により分画し、臭化エチジウムで染色してバンドの有無を確認した (文献 3 7 を参照)。

## 10. ジャガイモ塊茎からの可溶性画分の調製

ジャガイモ塊茎ディスクからの可溶性画分の調製は Dixon and Fuller, (1978) の方法 (文献 1 3 を参照) を一部改変して行った。

ジャガイモ塊茎ディスク 3 枚を 1 組にしてアルミホイルに包み、液体窒素中で

凍結固定し-80℃下保存した。凍結したジャガイモ塊茎ディスクを乳鉢中で液体窒素を加えながら乳棒により粉碎した。得られたジャガイモ塊茎粉末に、フェノール吸着剤であるポリクラ AT 2gを加え乳棒により攪拌した。その後 7 ml の抽出緩衝液[0.1M ホウ酸ナトリウム(pH 8.8) 1 mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)、10 mM 2-メルカプトエタノール]を加え懸濁した後冷却遠心(14,000rpm 20分 4℃)。得られた上清を-80℃下で保存した。

#### 11. 大腸菌での融合タンパク質の発現とその抽出

抗体の作製に用いる抗原を得るため、ジャガイモ PVS の大腸菌内での発現を行った。EcoRI、および XhoI により切断した発現ベクター pET-32b(+) (宝酒造) に PVS1 cDNA の翻訳可能領域全長を挿入し、得られたベクターを大腸菌(BL21, Novagen)に導入した。この大腸菌を 50  $\mu$ g/ml カルベニシリンを含む LB 寒天培地へ植菌し、37℃で一晩培養した。200  $\mu$ g/ml カルベニシリンを含む LB 液体培地 50 ml を入れた 500 ml フラスコを 4 本用意し、培地上のシングルコロニーをかき取り、各々のフラスコに懸濁した。 $A_{600} = 0.6$  になるまで 37℃で振盪培養(140 rpm)し、このうち 250  $\mu$ l を誘導前タンパク質試料として融合タンパク質の発現の確認に用いた。その後最終濃度 1 mM となるように IPTG を添加してタンパク質の発現を誘導し、さらに 37℃で 3 時間振盪培養(140 rpm)した。氷上で 5 分間冷却した後、培養液を遠心分離(5,000 rpm、10 分間)した。上清を取り除き、沈殿を 5 ml 大腸菌懸濁溶液[50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA]に再懸濁し、このうち 100  $\mu$ l を誘導後タンパク質試料として融合タンパク質の発現誘導の確認に用いた。再度培養液を遠心分離(5,000 rpm、10 分間)し上清を取り除き、大腸菌の沈殿を融合タンパク質の可溶性の確認に用いた。

融合タンパク質の発現誘導の確認および可溶性の確認は以下のように行った。

上記のようにサンプリングした誘導前および誘導後タンパク質試料を遠心分離(5,

000 rpm、30 秒間) した後上清を取り除き、沈殿を大腸菌懸濁溶液 100  $\mu$ l に再懸濁した。各々の懸濁液より 10  $\mu$ l ずつサンプリングした後、SDS-PAGE、ウエスタン解析を行った。SDS-PAGE およびウエスタン解析は 14. SDS-PAGE およびウエスタン解析の項目に従った。発現誘導を確認した後、融合タンパク質を発現誘導した大腸菌の沈殿を、あらかじめ氷冷した 5 ml Binding Buffer[5 mM イミダゾール、0.5 M 塩化ナトリウム、20 mM Tris-HCl(pH 7.9)]によく懸濁した。懸濁液を透明な遠心チューブに移し替え、遠心チューブを氷冷しながら超音波破碎機で大腸菌を破碎した。菌体懸濁液を遠心分離(12,000 rpm、10 分間)し、上清を可溶性画分とした。沈殿に 5 ml 尿素入り Binding Buffer(6 M 尿素を Binding Buffer に加えたもの)を加え再懸濁した後、懸濁液を遠心分離(12,000 rpm、10 分間)し、上清を尿素画分とした。可溶性画分、尿素画分から 10  $\mu$ l ずつサンプリングした後、SDS-PAGE、ウエスタン解析を行った。SDS-PAGE およびウエスタン解析は 14. SDS-PAGE およびウエスタン解析の項目に従った。

融合タンパク質が尿素画分に確認されたので、尿素有徐々に抜き、産生タンパク質の構造を再生した。タンパクの再生作業は以下のように行った。尿素画分を透析チューブに移し、200 ml の 4 M 尿素透析外液[4 M 尿素、10 mM Tris-HCl(pH 7.0)、5 mM DTT]に対して 4℃で 1 時間透析した。透析外液を 200 ml の 2 M 尿素透析外液(4 M 尿素透析外液のうち尿素濃度を 2 M に代えたもの)に交換し、4℃で 1 時間透析した。さらに透析外液を 200 ml の無尿素透析外液(4 M 尿素透析外液のうち尿素を除いたもの)に交換し、4℃で 1 時間透析した。再び透析外液を 200 ml の無尿素透析外液(4 M 尿素透析外液のうち尿素を除いたもの)に交換し、4℃で一晩透析した。この溶液をエッペンドルフチューブに移し、遠心分離(15,000 rpm、10 分間)した後、上清を新しいチューブに移した。この画分を再生画分とし、抗原として抗体の作製に用いた。以上の操作で、8 mg/ml の融合タンパク質が 4 ml 得られた。



## 12. 抗 PVS 抗体の作製

マウス (BALB/c、雌、4 週齢) を 5 日間飼育した後、大腸菌で発現させた融合タンパク質 100  $\mu$ g を含む溶液とコンプリートフロイントアジュバンド (DIFCO) を等量混合したエマルジョンを 100  $\mu$ l 腹腔に注射した。1 週間後、融合タンパク質 100  $\mu$ g とインコンプリートフロイントアジュバンド (DIFCO) を等量混合したエマルジョンを 100  $\mu$ l 腹腔に注射した。その 10 日後マウスの尾を切断して採血し、HMGR に対する抗体ができているかどうかをウエスタン解析法を用いて調べた。抗原抗体反応が認められたので再び融合タンパク質 100  $\mu$ g とインコンプリートフロイントアジュバンド (DIFCO) を等量混合したエマルジョンを 100  $\mu$ l 腹腔に注射した。一週間後に採血し、4℃で一晩静置して血餅を沈殿させた。この血液を遠心分離 (10,000 rpm、15 分間) し、上清を抗血清としてエッペンドルフチューブに少量ずつ分注し、-80℃で保存した。

## 13. タンパク質の定量

試料のタンパク質濃度の測定は、Bradford (1976) の方法によるタンパク質の定量キット (BIO-RAD) を用いて行った。検量線は BSA を用いて作成した。

## 14. SDS-PAGE およびウエスタン解析

タンパク質試料の SDS-PAGE は Laemmli (1970) の方法に準じた。試料 10  $\mu$ l を試料緩衝液 [2% SDS、10% メルカプトエタノール、0.002% BPB、20% グリセロールを含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.5)] 10  $\mu$ l と混合し、5 分間煮沸した後氷冷し、10% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。

ウエスタン解析は、Towbin et al. (1979) の方法 (文献 55 を参照) に従って行った。SDS-PAGE 後のゲル、濾紙、ニトロセルロース膜 (PROTRAN, Schleicher

and Schuell) をそれぞれ転写用緩衝液 (0.1 M Tris、0.192 M グリシン、20%  
メタノール、0.1% SDS) に 30 分間浸した後、セミドライプロッター (ATTO) のス  
テージに置き、2 mA/cm<sup>2</sup> の定電流で 60 分間通電してゲル中のタンパク質をニトロ  
セルロース膜に転写した。このニトロセルロース膜を 5% スキムミルクを含む TB  
5 S-T [137 mM 塩化ナトリウム、0.1% Tween 20 を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH  
7.6)] 中で一晩振盪し、ブロッキングを行った。この膜を TBS-T 中で 15 分間の洗  
浄を 1 回、5 分間の洗浄を 2 回行った後、一次抗体として抗ジャガイモ PVS 抗体  
(2,000 倍希釈) を含む TBS-T 中で 1 時間振盪した。再び膜を TBS-T 中で洗浄し  
た後、二次抗体として抗マウス Ig 抗体 (Amersham) を含む TBS-T 中で 30 分間振と  
10 うした。膜を TBS-T 中で洗浄後、ECL 検出キット (Amersham) を用いて Hyper Film  
(Amersham) 上にシグナルの検出を行った。

#### 15. プロープの作製

ジャガイモの PVS1~4 cDNA を組み込んだプラスミドを鋳型とし、図 2 3 に示す  
15 プライマーを用いてそれぞれの遺伝子の塩基配列に特異的な PCR により増幅した。  
反応は、TaKaRa TaqTM (宝酒造) およびインサート DNA を組み込んだプラスミド  
2 ng を用い、DNA サーマルサイクラー PJ2000 (Perkin Elmer Cetus) で 94°C - 1  
分間 (熱変性)、53°C - 45 秒間 (アニーリング)、72°C - 2 分間 (DNA 伸長反応)、  
25 サイクルという条件下で行った。0.8% アガロースゲル電気泳動により増幅さ  
20 れた DNA 断片のサイズを確認した。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用い  
てゲルより DNA 断片を精製した。

#### 16. ジャガイモゲノムライブラリーのスクリーニング

ゲノムライブラリーは、既製のジャガイモゲノムライブラリー (ジャガイモ品  
25 種 Desiree, Clontech) を用いた。

ファージクローンの選抜はプラークハイブリダイゼーション法(文献 3 7 を参照)により行った。1 プレート当たり 30,000 プラークとなるように調整したファージ溶液と 200  $\mu$ l の宿主大腸菌 XL1-Blue MRA(P2) strain (10 mM 硫酸マグネシウム、 $A_{600} = 2$ ) を混合し、37°C 下で 20 分間静置した後、3 ml NZYM トップアガロース (1% NZ アミン、0.5% 酵母エキス、10 mM 硫酸マグネシウム、0.5% 塩化ナトリウム、0.6% アガロース) に混合し、NZYM 寒天培地 (1% NZ アミン、0.5% 酵母エキス、10 mM 硫酸マグネシウム、0.5% 塩化ナトリウム、1.5% 寒天粉末) 上に重層接種した。プラーク直径が約 0.5 mm になるまで 37°C 下で培養した後、4°C 下に一時間以上静置した。培地上のプラークを Hybond-N+ ナイロン膜 (Amersham) に吸着させ、変性溶液 (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) で 7 分間、中和溶液 [1.5 M 塩化ナトリウム、0.5 M Tris-HCl (pH 7.2)、1 mM EDTA] で 3 分間処理した後、2 x SSPE で洗浄した。さらに、0.4 M 水酸化ナトリウムによって DNA を膜上に固定した後、5 x SSPE (2 回) で洗浄した。合計で  $6.0 \times 10^5$  クローンから目的のクローンを選抜した。

1 次スクリーニングの後、PVS1~4 各メンバー特異的なプライマーを用いた PCR により想定されるサイズのバンドが確認された PVS1、PVS3 および PVS4 を選び、2 次、3 次スクリーニングを行った。

プローブの作製、ハイブリダイゼーション、洗浄およびオートラジオグラフィは、18. で述べるサザンハイブリダイゼーションの場合と同様に行った。

20

#### 17. ファージ DNA の単離・精製

ファージ DNA の単離・精製は、液体培養法(文献 2 3 を参照)とポリエチレングリコール(PEG)沈殿法(文献 3 7 を参照)に基づいて、以下の方法により行った。目的のプラークを寒天より回収し、100  $\mu$ l の SM 溶液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.1 M 塩化ナトリウム、7 mM 硫酸マグネシウム、0.01% ゼラチン] および 1  $\mu$ l ク

クロロホルムを含む 1.5 ml チューブに移して 4℃ に一晩静置した後、よく懸濁した。200 ml フラスコを用い、宿主大腸菌 [XLI-Blue MRA (P2) strain] を 80 ml NZYM (1% NZ アミン、0.5% 酵母エキス、10 mM 硫酸マグネシウム、0.5% 塩化ナトリウム) で 30℃ 下で一晩振盪培養した。遠心分離 (8,000 rpm、3 分間、4℃) に  
5 より沈殿した宿主大腸菌を回収した後、10 mM 硫酸マグネシウム溶液中に懸濁し、 $A_{600}=2$  に調整した。このように調製した 500  $\mu$ l の宿主大腸菌懸濁液と 50  $\mu$ l のファージ懸濁液を混合し、37℃ 下に 20 分間静置した後、50 ml NZYM を用いて 37℃ 下で振盪培養し溶菌を確認した。2.9 g 塩化ナトリウムおよび 0.4 ml クロロホルムを添加し、さらに 10 分間振盪した。遠心分離 (10,000 rpm、10 分間、4℃) に  
10 より上清を回収し、上清の 5 分の 1 量の 50% PEG 6000 を混合した後、氷中に 1 時間静置した。遠心分離 (12,000 rpm、20 分間、4℃) により沈殿を回収し、400  $\mu$ l Tris-Mg-NaCl [10 mM Tris-HCl (pH7.5)、49.6 mM 塩化ナトリウム、4.9 mM 塩化マグネシウム] に懸濁した。この溶液に 4  $\mu$ l の 10 mg/ml RNase A (Sigma) および 4  $\mu$ l の 10 mg/ml DNase I (Sigma) を添加し、37℃ 下で 1 時間処理した後、ク  
15 ロロホルム抽出を 3 回行った。回収した上層と等量の 2 x STE [80 mM Tris-HCl (pH7.5)、2% SDS、0.5 M EDTA] および 5 分の 1 量の 10 mg/ml プロテイナーゼ K を添加して、65℃ 下で 10 分間処理した後、同容量の Tris 飽和フェノール、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1, v/v/v)、クロロホルム：イソアミルアルコール (24:1, v/v) によって、順次抽出した。回収した上層に 2  
20 倍量の冷エタノールを加え、-20℃ 下で 30 分間静置した後、遠心分離 (12,000 rpm、10 分間、4℃) により沈殿を回収した。沈殿を 70% エタノールで洗浄後、減圧乾燥し、100  $\mu$ l の H<sub>2</sub>O に溶解した。

#### 18. サザン解析

25 目的のクローンの全 DNA を所定の制限酵素 (宝酒造) により消化し、0.8% ア

ガロースゲル電気泳動により分画した(文献 3 7 を参照)。分画した DNA 断片をアルカリブロットティング法(文献 3 6 を参照)により Hybond-N+ナイロン膜(Amersham)上に転写した。

<sup>32</sup>P 標識 DNA プローブは、ランダムプライミング法(Feinberg and Vogelstein, 1983)により [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP(ICN Biochemicals)および Megaprime DNA Labelling systems(Amersham)を用いて作製した。

DNA を吸着させたナイロン膜を、42℃のプレハイブリダイゼーション溶液[5 x デンハルト溶液(文献 3 7 を参照)、5 x SSPE(文献 3 7 を参照)、0.5% SDS、100  $\mu$ g/ml 熱変性サケ精子 DNA(Pharmacia)]中で 1 時間以上放置した後、<sup>32</sup>P 標識 DNA プローブを添加し、42℃下で 16 時間以上ハイブリダイゼーションを行った。この膜を 0.1% SDS 含有 2 x SSPE 中で 10 分間(2 回)、さらに 0.1% SDS 含有 1 x SSPE 中で 10 分間(1 回)順次洗浄した。なお、洗浄はすべて室温下で行った。オートラジオグラフィーは、X 線フィルム OMAT-AR(Kodak)および増感紙 Lighting Plus(Dupont)を用いて、-80℃下で行った。

15

#### 19. プラスミドの調製

塩基配列を決定するための目的 DNA 断片のサブクローニングには、pBluescript KS+ (Stratagene) を用いた。

目的のクローンの全 DNA を所定の制限酵素(宝酒造)により消化し、0.8% アガロースゲル電気泳動により分画した後(文献 3 7 を参照)、目的の DNA 断片を含むアガロースゲルを QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)を用いて精製した。制限酵素により消化したベクターは、Alkaline phosphatase E. coli C75(宝酒造)による脱リン酸化処理(37℃、1 時間)を行った後、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1, v/v/v)、クロロホルム：イソアミルアルコール(24:1, v/v)によって、順次抽出した。回収した上層に 2 倍量の冷エタノールお

25

よび 20 分の 1 量の 3 M NaCl を加え、-20℃下で 30 分間静置した後、遠心分離（1 2,000 rpm、10 分間、4℃）により沈殿を回収した。沈殿を 70% エタノールで洗浄後、減圧乾燥し、20 μl TE[10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA]に溶解した。以上のように調製したベクターおよびインサートを、ベクター：インサートのモ  
5 ル比が 1:1 となるように調整し、DNA Ligation Kit ver. 2（宝酒造）によりライゲーションした。E. coli JM109 Competent Cell（宝酒造）を、ライゲーションしたプラスミド DNA で形質転換した後、LB/Amp/X-gal/IPTG 寒天培地上（1% Bacto Trypton、0.5% 酵母エキス、1% 塩化ナトリウム、0.1 mg/ml アンピシリン溶液、0.004% X-gal 溶液、0.5 mM IPTG 溶液、1.5% 寒天粉末）に接種し、37℃下  
10 で一晩培養した。青白選択した単コロニーを LB/Amp 液体培地（2 ml LB、0.1 mg/ml アンピシリン）で一晩培養し、プラスミド DNA の単離を行った。プラスミド DNA の抽出および精製は、FlexiPrep Kit(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて行った。

## 15 20. DNA 塩基配列の決定とデータベース解析

塩基配列の決定は、デオキシターミネーション法（文献 38 を参照）に基づく PRISM Dye Deoxy Termination Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Applied Biosystems)を用いて行った。反応物の変性ポリアクリルアミドゲル中での電気泳動と塩基配列の読みとりには、ABI 373S DNA シーケンサー・DNA シーケンス自動解  
20 析装置（Applied Biosystems）を用いた。塩基配列の結合、読み枠のアミノ酸配列と既知遺伝子との相同性について、国立遺伝学研究所日本 DNA データバンク（DDBJ）の大型コンピューターの BLAST プログラム（文献 1 を参照）を用いて解析した。アミノ酸配列の整列には、CLUSTALw プログラム（文献 43 を参照）を用いた。

## 25 21. ジャガイモ塊茎プロトプラストを用いたトランジェントアッセイ

ジャガイモ塊茎プロトプラストを用いたトランジェントアッセイは Hashimoto et al. (1992)の方法（文献 18を参照）を参考に、以下のように行った。ジャガイモ培養細胞由来のプロトプラストを  $1 \times 10^6$  個含む溶液  $800 \mu\text{l}$  ( $0.5 \text{ M mannitol}$ ,  $0.1 \text{ mM MgSO}_4$ ,  $\text{pH } 7.0$ )に、導入する遺伝子を  $25 \mu\text{g}$  加え、ピペティングにより静かに混和し、氷上で 10 分間静置した。この溶液を、あらかじめ冷やしておいたキュベットに移し、遺伝子導入装置 CUY21（トキワサイエンス）を用いて定電流条件でエレクトロポレート ( $60\text{v}$ ,  $50 \text{ pon}$ ,  $75 \text{ poff}$ , 4 回)した。溶液を遠心チューブに移し、氷上に 10 分間静置した後、上清を取り除き、 $900 \mu\text{l}$  培養液を加え、12 穴培養プレートに移し、 $20^\circ\text{C}$ の暗所に 1 時間静置した。その後 PVS3 の推定プロモータ領域を含むベクターをエレクトロポレートしたプロトプラストには、滅菌水を  $100 \mu\text{l}$  もしくは  $1 \text{ mg/ml HWC}$  を  $100 \mu\text{l}$  加えて 12 時間静置した。なお、ポジティブコントロールには CaMV 35S プロモータ領域を含むベクターを用い、エレクトロポレートしたプロトプラストは、12 時間静置した。上清を取り除き、プロトプラストを  $1 \times \text{PBS}$  で洗浄した後、Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega)を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

## 22. 形質転換植物の作製および GUS 染色

形質転換植物の作製および GUS 染色は Jefferson(1987)の方法（文献 19を参照）に準じた。形質転換植物の作製には、無菌的に培養されたメークインの茎を用いた。形質転換ベクター pBI121(Clontech)の CaMV35S プロモータを削除し、翻訳開始コドン上流 2648 bp の PVS3 推定プロモーター領域を GUS 遺伝子の上流にインフレームで GUS が翻訳されるように BamHI を介して連結した(図 11)。このベクターを *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Clontech) にエレクトロポレーション法で導入した。切除した茎を 2 分間 *A. tumefaciens* の培養液中に浸すことで感染させ、シャーレ中の 3C5ZR 培地上 [Sucrose 30 g, GellanGum 2 g., MS

mineral (10x) 100 ml, Fe-EDTA 5 ml, Myo-inositol 100 ml, 3C5ZR vitamin (Thiamin HCl 1 mg/ml 1 ml, Nicotinic acid 1 mg/ml 0.5 ml, Pyridoxine HCl 1 mg/ml 0.5 ml, Asparatic acid 1 mg/ml 0.4 ml) 2.4 ml, IAA (0.1 mg/ml) 5.3 ml, Zeatin riboside (0.1 mg/ml) 17.5 ml, pH 5.9, per 1000 ml]に 20℃  
5 下で3日間静置した。その後、カナマイシン(100 µg/ml)および Cefotaxime(300 µg/ml)を含む 3C5ZR 培地上に移した。これを一週間ごとに繰り返し、シュートが出現したら S1 再生培地上(Sucrose 15 g, GellanGum 3 g,, S1 mineral (10x) 100 ml, Fe-EDTA 5 ml, V2 vitamin 2.0 ml, pH 5.7, per 1000 ml)に移して、根の再生を確認する。

10 GUS 染色する際は、植物組織を GUS 染色溶液中[X-Gluc (50 mg/ml in DMF) 100 µl, 500 mM Phosphate buffer(pH 7.0) 1 ml, 100% Methanol 2 ml, 0.5% Triton X-100. 7.9 ml, per 10 ml]に減圧浸透し、37℃の暗黒条件下で一昼夜染色する。その後、染色組織を酢酸：エタノール：グリセロール(1：3：1)の脱色液中で煮沸脱色して観察した。また、接種されたジャガイモ疫病菌を顕微鏡観  
15 察する際は、脱色した組織をラクトフェノール溶液中(lactic acid 10 ml, phenol 10 g, glycerol 10 ml water 10 ml, 40 ml ethanol)で煮沸し、これを繰り返した。その後、飽水クロラル(2.5 g/ml)を染み込ませた濾紙上で2日間、4℃の暗黒条件下で脱色して観察した(文献 49 を参照)。

20 23. ジャガイモ葉組織における *Agrobacterium tumefaciens* を介したトランジェントアッセイ

A. *tumefaciens* を介したトランジェントアッセイは、Chang et al. (2002)の方法(文献 7 を参照)に準じて行った。Cf-9/Avr9 または StMEK<sup>DD</sup> (配列番号 7)を含むバイナリーベクターをエレクトロポレーションにより導入した A. *tumefaciens* LBA4404 を、リファンピシン(50 µg/ml) および所定の抗生物質を加えて培養  
25



した。*A. tumefaciens* を遠心 (3,000 rpm, 15 分間) により集菌し、導入緩衝液 (1/10x Murashige-Skoog salts, 1/10x B5 vitamins, 2% sucrose, 1% glucose, 150  $\mu$ M acetosyringone, 20 mM MES pH 5.4) で懸濁して OD<sub>600</sub>=0.1 になるように濃度を調整した。1 ml のシリンジを用いて葉の裏から懸濁液を注入し、2 日後

5 に GUS 染色した。

#### <実施例 1> 疫病菌接種したジャガイモ塊茎組織における PVS mRNA の蓄積動向

ジャガイモ塊茎組織において、親和性、非親和性レース接種および、水処理後、

10 経時的にジャガイモ塊茎ディスク 3 枚より全 RNA を抽出して、PVS1 cDNA を用いてノーザン解析を行った。解析結果を図 2 に示す。親和性菌処理区、非親和性菌処理区双方において、PVS mRNA の蓄積が認められた。

#### <実施例 2> 疫病菌接種したジャガイモ塊茎組織における PVS1~4 各メンバー

15 特異的な RT-PCR

ジャガイモ塊茎組織において、PVS1~4 のいずれのメンバーが発現しているのかを調べるために、親和性、非親和性レース接種および、水処理後、3、6 時間後凍結したジャガイモ塊茎ディスク 3 枚より全 RNA を抽出して、PVS1~4 各メンバー特異的なプライマー (配列番号 9、10、13、14、15、16、17、及び

20 18) を用いて RT-PCR を行った。親和性菌処理区、非親和性菌処理区双方において、PVS1~4 それぞれ 469 bp、132 bp、326 bp および 469 bp の推定されるサイズにバンドが検出された (図 3)。

#### <実施例 3> 非親和性レースおよび親和性レースを接種したジャガイモ塊茎組

25 織における PVS タンパク質のウエスタン解析

PVS mRNA の蓄積動向が実際のタンパク質合成に反映されているのか調べるため、抗ジャガイモ PVS 抗体を作製し、ウエスタン解析を行った。抗体の作製に用いる抗原を得るため、推定アミノ酸配列を基に大腸菌内での発現を行った。PCR により調製した PVS1 cDNA 翻訳領域を発現ベクターに挿入して、チオレドキシンとの融合タンパク質として大腸菌内で発現させた。発現誘導前後の大腸菌全タンパク質について SDS-PAGE を行い、ゲルを CBB 溶液で染色した。尿素画分に約 83 kD のバンドが検出できたので、この画分から尿素を透析除去し、抗体作製の抗原として用いた。

作製した抗体を用いて抗体の力価を検討したところ、1,000 倍希釈にして用いた場合、10 ng の抗原を検出することができた。以後のウエスタン解析を行うのに十分な力価を有した抗体であると判断されたので、24 時間エイジングした後、水処理、非親和性レースまたは親和性レースを接種して 24 時間後までジャガイモ塊茎ディスクより可溶性画分を調製し、抗ジャガイモ PVS 抗体を用いてウエスタン解析を行った(図 4)。非親和性および親和性レースのいずれの接種区においても、6 時間以降に PVS タンパク質の蓄積が認められた。一方、水処理区では PVS タンパク質の蓄積は認められなかった。これらの結果は、PVS mRNA の蓄積が、菌接種 6-9 時間後をピークとする図 2 の結果を支持するものであると考えられる。

#### ＜実施例 4＞ 疫病菌接種したジャガイモ葉組織における PVS1~4 各メンバー特異的な RT-PCR

ジャガイモ葉組織において、PVS1~4 のいずれのメンバーが発現しているのかを調べるために、親和性、非親和性レース接種および水処理、傷害処理後、12 時間後まで経時的にジャガイモ葉 3 枚より全 RNA を抽出して、PVS1~4 各メンバー特異的なプライマー（配列番号 11、12、13、14、15、16、19、及び 20）を用いて RT-PCR を行い、その後 PVS1~4 各メンバー特異的な cDNA プロ

ープを用いてサザン解析した。親和性菌接種区、非親和性菌接種区双方において、PVS3 においてのみ 326 bp の推定されるサイズに著しい mRNA の蓄積を示すバンドが検出された(図 5)。また、ポジティブコントロールとし用いた塊茎組織由来の RNA を用いた場合においては PVS1~4 それぞれ 176 bp、132 bp、326 bp および 1  
5 31 bp の推定されるサイズにバンドが確認された(図 5)。

#### <実施例 5> ジャガイモゲノムライブラリーのスクリーニング

ジャガイモのゲノムサイズは 1 倍体当たり  $1.6 - 1.8 \times 10^9$  bp であり (Arumuganathan and Earle, 1991)、ジャガイモゲノムライブラリーのサイズ平均値が 1  
10 プラークあたり  $1.5 \times 10^4$  bp であること、またジャガイモが 4 倍体であることを考えると、ジャガイモの全染色体をスクリーニングするためには、少なくとも  $5.2 \times 10^5$  個のプラークをスクリーニングする必要がある。そこで、PVS1 cDNA の全長をプローブとして、 $6.0 \times 10^5$  個のプラークをスクリーニングした。1 次スクリーニングの結果、87 クローンが確認された。これら、87 クローンのうち、PVS1  
15 ~4 を区別すると共に、推定プロモータ領域を得るため、PVS1~4 それぞれのメンバー特異的な部位でプライマーを構築し、その PCR 産物を電気泳動した。PVS1、PVS3 および、PVS4 をそれぞれ、3 クローン選択して 2 次、3 次スクリーニングを行った。

スクリーニングの結果得られたクローンを EcoRI、HindIII または XhoI により  
20 単独消化し、スクリーニングの際用いたプライマーによる PCR 産物をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、このプローブとハイブリダイズするバンドが検出された。目的のクローンが得られたことが確認されたので、ハイブリダイズした EcoRI および HindIII 消化による DNA 断片を pBluescript KS+ベクターにサブクローニングし、塩基配列を決定した。

### ＜実施例 6＞ DNA 塩基配列の決定とデータベース解析

サブクローニングした PVS1、PVS3 および PVS4 の DNA 断片の全塩基配列の決定を行った（図 6、7、8、9）。尚、図 6 及び図 7 には PVS3 のプロモータ領域（配列番号 1）及びコード領域（配列番号 21）が示される。PVS3 cDNA および PVS3 のゲノム構造について調べるため、既に単離されている PVS3 cDNA（文献 53 を参照）と本実施例で得られた PVS3 ゲノム DNA 配列を比較した。PVS3 については 3' 非翻訳領域を除いて全ての塩基配列および推定されるアミノ酸配列が一致し、6 つのイントロンで分断されることが明らかになった（図 8）。一方、PVS1、および PVS4 双方とも、5 つのイントロンで分断されており、PVS3 とは異なっていた（図 9）。ジャガイモ植物の栽培品種は 4 倍体であり、各アイソジーンがゲノム中に複数存在する例が知られている（文献 56）。本実施例で得られた PVS3 ゲノムクローンも 3' 非翻訳領域のみが PVS3 cDNA と異なっていたことから、PVS3 サブファミリーの一つをコードする遺伝子であると思われる。

Back and Chappel (1996) は、セスキテルペンシクラーゼにおける機能分化について報告している（文献 4 を参照）。タバコ (TEAS)、トウガラシ (PEAS) のセスキテルペンシクラーゼである 5-エピ-アリストロキンシンターゼと、ヒヨス (HVS)、ジャガイモ (PVS) のベティスピラディンシンターゼの推定アミノ酸配列を比較した。同じ VS である HVS と、PVS3 または PVS4 の間において vetipiradine specific domain では、90% 以上の Identity が確認された（図 9）。一方、PVS3 と PEAS の間では 80% 以下であった。また、基質結合部位の存在する aristolochene specific domain においては、PVS と TEAS、または PVS と PEAS の間では、Identity が 78% ~ 89% であるのに対し、PVS と HVS の間では、98% 以上という高い Identity が確認できた。さらに、葉組織で発現するセスキテルペンシクラーゼは 6 つのイントロンに分断される 7 つのエクソンから成るのに対し、ジャガイモ塊茎組織で発現する PVS1 および PVS4 は 5 つのイントロンに分断される 6 つのエクソンから成る

ことが明らかになった（図 9）。

＜実施例 7＞ プロトプラストを用いたトランジェントアッセイによる PVS3 プロモータの HWC 応答性

- 5      ルシフェラーゼの上流に PVS3 推定プロモータ領域を連結して作製した pGL3 ベクターをエレクトロポレーションでプロトプラストで導入し、HWC に対する応答性を調べた（図 10）。水処理区に比べ、HWC 処理区では有意に高いルシフェラーゼ活性が認められ、本実験に用いた翻訳開始コドン上流の 2,648 bp の領域がエリクターに応答することが明らかになった。

10

＜実施例 8＞ 形質転換植物における PVS3 遺伝子の発現動向

詳細に PVS3 の発現動向を調べるために、GUS 遺伝子上流に PVS3 推定プロモータ領域を連結して作製したバイナリーベクター（図 11）をジャガイモ疫病菌に対する真正抵抗性遺伝子を持たないメークインに導入した形質転換体を作出した。

- 15      傷害に対する PVS3 遺伝子の応答を調べる目的で、形質転換ジャガイモ葉組織の一部を切除して経時的に GUS 染色した（図 12）。その結果、切除部位は 48 時間後においても GUS 染色されなかった。したがって、本プロモータは傷害に応答しないことが示された。

- 20      疫病菌に対する応答を調べる目的で、疫病菌親和性レースを接種して顕微鏡観察したところ、6 時間以内に GUS 染色が侵入細胞で確認された（図 13）。さらに、接種 48 時間後になると接種葉全体に強い発現が認められた。これらのことは、本プロモータが疫病菌親和性レースの感染に応答することを示している。

- 25      本プロモータが恒常的に発現する器官の存在を調べるために、形質転換ジャガ

イモ植物全体を GUS で染色した(図 1 4)。GUS 染色のポジティブコントロールとして用いた疫病菌接種葉組織を除いて、成長点や根などの部位において染色は認められなかった。この結果は、本プロモータが病原菌特異的に応答することを示唆している。

5

本プロモータがいずれの病害シグナルに応答するかを調べるために、葉組織を各種エリシターで処理して GUS 染色した(図 1 5、1 6、1 7、1 8)。ジャガイモ疫病菌の膜の構成脂肪酸であるアラキドン酸で処理した場合、24 時間以降になると GUS での染色が確認された(図 1 5)。一方、活性酸素種の一つである過酸化水素処理や、過酸化水素を生成するグルコース・グルコース酸化酵素処理、または、全身獲得抵抗性に関与しているサリチル酸のいずれで処理しても GUS 染色は認められなかった(図 1 6、1 7、1 8)。

トマト葉かび病菌 *Cladosporium fulvum* の特異的エリシターである Avr9 に対応するトマト品種の抵抗性遺伝子産物 Cf-9 が応答すると、情報伝達機構が始動し、過敏反応が誘導されることがよく知られている(文献 4 1を参照)。Cf-9/Avr9 をアグロバクテリウムを介して一過的に葉組織に発現させたところ、GUS で染色された(図 1 9)。さらに、これら抵抗性遺伝子の下流に存在し、種々の防御反応を司ることが知られている salicylic acid-induced protein kinase(SIPK)および wound-induced protein kinase(WIPK)をリン酸化して活性化する恒常的活性変異酵素 StMEK<sup>DD</sup>(配列番号 7、8)を同様に発現させた結果、GUS 活性が認められた(図 1 9)。一方、コントロールに用いたインサートを持たないバイナリーベクターを含むアグロバクテリウムを接種した葉組織では GUS 染色は認められなかった。

25

リシチン合成において重要な役割を果たす HMG-CoA reductase (HMGR) 遺伝子は多重遺伝子族を形成している (図 1)。HMG1 は傷害に応答してステロイドグリコアルカロイド生産に貢献し、一方、HMG2 および HMG3 は病害シグナルにより誘導され、リシチン合成に貢献することが知られている (文献 9 を参照)。ジャガイモ植物における PVS 遺伝子も同様に多重遺伝子族を形成し、PVS1~4 のメンバーが存在することが報告されている (文献 5 3 を参照)。本研究では、ジャガイモ塊茎組織および葉組織における PVS1~4 各メンバーの発現動向を調べるため、各メンバー特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。疫病菌の親和性および非親和性レース接種を施したジャガイモ塊茎ディスクより抽出した全 RNA を鋳型として RT-PCR を行った (図 3)。いずれのレースを接種した場合においても、PVS1~4 全てのメンバーのバンドが推定されるサイズに検出された。これらの結果は、少なくとも塊茎組織においては PVS のメンバーは刺激に応答した代謝変動に対して異なった役割を持たない可能性を示すものと思われる。

PVS mRNA の蓄積動向がジャガイモ塊茎組織における PVS タンパク質合成に反映されているのか調べるため、抗ジャガイモ PVS 抗体を作製し、ウエスタン解析を行った (図 4)。非親和性レース、および親和性レース接種により接種後 6 時間から 24 時間において PVS タンパク質の蓄積が認められた。ジャガイモ塊茎組織より抽出した全 RNA を用いてノーザン解析した結果、非親和性レースおよび親和性レース接種区では PVS mRNA が接種後 6-9 時間をピークに一過的に蓄積することが報告されている (図 2、文献 5 3)。PVS mRNA の蓄積動向を考慮すると、PVS タンパク質の半減期は長いものと思われる。また、非親和性レースおよび親和性レース接種を施したジャガイモ塊茎組織より調製した可溶性画分において、PVS 酵素活性がいずれの場合においても増加することが報告されている (文献 5 4 を参照)。

この報告は、非親和性レース接種によってのみファイトアレキシンが蓄積すると

した報告と矛盾する（文献 40 を参照）。ジャガイモにおけるファイトアレキシン  
生合成においては、3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) からメバロン酸  
を生合成する酵素である HMGR とファルネシルニリン酸からベティスピラディン  
を生合成する PVS の二つが重要な役割を果たすと考えられている（文献 29、5  
5 4、及び 9 を参照）（図 1）。HMGR 活性が非親和性レース接種区においてのみ著し  
く増加し、親和性レース接種区では時間経過とともに減少することが報告されて  
いる（文献 52 を参照）。HMGR の活性動向を考慮すると、ジャガイモ品種－疫病  
菌レース間の特異的なファイトアレキシン合成制御はメバロン酸の供給が鍵を握  
るものと考えられる。この可能性を確かめるために、親和性レースを接種した塊  
10 茎組織に PVS の基質であるファルネシルニリン酸を外部から供与することで、フ  
ァイトアレキシンであるルビミンおよびリシチンが蓄積するか否かを調べる必要  
があるものと思われる。

ジャガイモ疫病菌の実際の第一感染組織は葉組織である。本研究では、疫病菌  
15 接種により PVS1～4 いずれのメンバーが発現しているのかを調べるために、親和  
性、非親和性レース接種および水処理後経時的に葉組織から抽出した全 RNA を鋳  
型として RT-PCR を行った（図 5）。親和性、非親和性レース接種区双方において、  
PVS3 のみが顕著に誘導されることが確認された。一般に、ジャガイモ葉組織にお  
いて、リシチンは蓄積しないものとして知られている（文献 34 を参照）。しかし  
20 ながら、一過的に葉組織においてもリシチンが合成されたとした観察例がある  
（文献 26 を参照）。防御応答における葉組織でのリシチンの役割は現在のところ  
明らかではないが、親和性レース接種により PVS3 が誘導されることは、本プロモ  
ータを利用した病害耐性作物の作出を可能なものとした。そこで、PVS3 プロモ  
ータ配列を得るために、ゲノムクローンを単離した。スクリーニングの結果、PVS1、  
25 PVS3 および PVS4 が得られた（図 6、7、8、9）。今回単離された PVS3 ゲノム



クローンおよび既に単離されている PVS3 cDNA とを比較したところ、全ての推定されるアミノ酸配列が一致した。エクソン領域における制限酵素サイトは一致しており、それぞれ対応していた(図 8)。

- 5      タバコおよびトウガラシのファイトアレキシンであるカプシジオールとヒヨスおよびジャガイモの生産するリシチンは双方とも類似した生合成経路で合成される(文献 4、及び 29 を参照)(図 1)。前者の合成に関与するセスキテルペンシクラーゼは 5-エピー-アリストロキンシンターゼ(EAS)であり、タバコ(TEAS)とトウガラシ(PEAS)の EAS はアミノ酸レベルで極めて類似している(文献 53 を参照)。Back and Chappell は、TEAS とヒヨスの HVS cDNA を用いて様々なキメラ遺伝子を構築し、大腸菌内でキメラ遺伝子からタンパク質を合成した(文献 4 を参照)。菌体可溶画分に EAS および VS の基質であるファルネシルニリン酸を加え、5-エピー-アリストロキンまたはベティスピラディンの生産の割合を定量することで、両酵素の活性を司る領域を推定した。彼らの報告に従い、各エクソンで規定される活性ドメインの推定アミノ酸配列を比較したところ、vetipiradine specific domain では、ヒヨスの HVS と PVS4 または PVS3 の間において 90% 以上の Identity が確認された。また、基質結合部位の存在する aristolochene specific domain においては PVS と TEAS または PEAS の間では、Identity が 78%~89% であるのに対し、PVS と HVS の間では、98% 以上の高い Identity が認められた(図 9)。この結果は、Back and Chappell が提唱した説(文献 4 を参照)を支持するものである。さらに、PVS1 および PVS4 は 5 つのイントロンに分断される 6 つのエクソンから成るのに対し、葉組織で発現する PVS3 や他のセスキテルペンシクラーゼは 6 つのイントロンに分断される 7 つのエクソンから成ることが明らかになった(図 9)。
- 宮田(1984)は、ミトコンドリアゲノムにおいて効率よく複製を行うために機能を持たない場合のイントロンは除去され、進化の過程で DNA が縮小化すると推定し

た。彼の説に従うと、塊茎で発現する PVS1 および PVS4 の第 5 イントロンは、進化の過程でイントロンが除去され縮小化したものとも考えることもできるであろう。

プロモータを利用した病害耐性植物の作出を考えると、PVS3 プロモータ領域の  
5 解析・同定をすることが必要であると思われる。本実施例では、PVS3 の推定プロモータの下流に GUS 遺伝子を連結し、形質転換ジャガイモ植物を作出して本プロモータの応答性について詳細に調べた。興味深いことに、本プロモータは傷害には応答しなかっただけではなく(図 1 2)、成長点や根などの部位において染色は認められなかった(図 1 4)。タバコ植物のセスクテルペンシクラーゼである TEAS  
10 のプロモータの下流に同様に GUS を連結した形質転換タバコ植物が作出され、その発現動向について報告されている(文献 5 1 を参照)。彼らは、低レベルではあるが、傷害に応答し、さらに、根や茎においても GUS 活性が認められたと報告している。この報告に従うと、ジャガイモ葉組織における PVS3 プロモータとタバコ葉組織における TEAS プロモータの応答様式は異なっているものと思われる。タバ  
15 コ葉においては、病原菌の攻撃やエリシター処理に応答してファイトアレキシンであるカブシジオールが高濃度に蓄積する。一方、ジャガイモ葉組織におけるリシチン蓄積は認められず、PVS3 mRNA 蓄積は RT-PCR で検出される程度の低レベルなものであった(図 5)。この結果を考慮すると、PVS3 プロモータの特異的応答性は発現レベルの低さに起因するかもしれない。

20

最近になって、HMGR 遺伝子発現が mitogen-activated protein(MAP)キナーゼの一種である SIPK により制御されることが報告された(文献 3 3 を参照)。本研究においても、SIPK および WIPK をリン酸化して活性化する恒常的活性変異酵素 S tMEK<sup>DD</sup>(文献 5 0 を参照)を同様に発現させた結果、GUS 活性が認められた(図 1  
25 9)。さらに、トマト葉かび病菌 *Cladosporium fulvum* の特異的エリシターであ

る Avr9 およびトマト品種の抵抗性遺伝子産物 Cf-9 をアグロバクテリウムを介して一過的に葉組織に発現させたところ、GUS が染色された(図 19)。Romeis et al. は、Cf-9 を形質転換したタバコ植物および培養細胞を Avr9 で処理すると、SIPK および WIPK が活性化されることを報告した(文献 35 を参照)。これらの結果より、PVS3 プロモータも HMGR 遺伝子同様に SIPK により制御されるものと思われる。この考えは、HWC やアラキドン酸でジャガイモ塊茎組織を処理すると、SIPK に相当する MAP キナーゼが活性化されることから支持されるであろう(文献 20 を参照)。これらの想定される情報伝達経路を 図 20 に示した。

10      MAPK カスケードは植物のシグナル伝達経路における重要な制御因子の一つであり、近年注目を集めている(文献 65)。その中でも、SIPK および WIPK は、植物の病害抵抗性発現に重要な役割を果たすことが明らかになりつつある(文献 57)。MAPK カスケードの上流に位置する MAPKKK が MAPKK をリン酸化することで活性化し、さらに MAPKK が MAPK をリン酸化することで種々の防御反応を引き起こすことが知られている。最近になって、タバコ的一种であるベンサミアナ葉(*Nicotiana benthamiana*)に MAPKK である StMEK1 の恒常的活性型変異酵素 StMEK1<sup>DD</sup>を過剰発現させると、SIPK および WIPK が活性化され、タバコ植物のセスキテルペンシクラーゼである 5-エピ-アリストロキンシンターゼ(TEAS)が誘導されることが示された(文献 64)。ジャガイモの PVS 遺伝子調節においても、タバコ植物

20      同様に MAPK カスケードが関与することは容易に予想される。以下の実施例では、ウイルス誘導型遺伝子サイレンシング(virus-induced gene silencing; VIGS)の手法を用いてこの可能性について探った。VIGS は、植物遺伝子の機能を解析する上で効果的な遺伝子ノックダウン法として近年注目を集めている(文献 59)。VIGS は、本来ウイルスに対する生体防御システムであり、ウイルス内の遺伝子と

25      ホモロジーの高い宿主遺伝子の転写産物が特異的に分解される現象である。一般

に、ウイルス内に導入された植物遺伝子断片と、80 %以上のホモロジーを示す mRNA が分解されるため、1 遺伝子のみならず多重遺伝子族を形成する遺伝子をノックダウンするのに有効である。この手法は、形質転換体や変異体の作製に比べ、簡便かつ迅速である。中でも、ジャガイモ X ウイルス (PVX) とベンサミアナの系は、逆行性遺伝学的な機能解析法として多くの研究成果が蓄積されている (文献 6 7、文献 7 0)。そこで、VIGS により SIPK または WIPK をノックダウンし、上で述べた PVS3:GUS をアグロバクテリウムにより一過的に葉組織に導入して PVS3 プロモータ活性を調べた。

10 以下の実施例 9 ~ 1 2 において使用される生物学的材料、試薬、実験方法等は次の通りである。尚、特に説明のない材料等については上記実施例で使

#### 1. 供試植物

15 供試植物として日本たばこ株式会社から分譲されたベンサミアナ (*Nicotiana benthamiana*) を用いた。ベンサミアナ種子を、クレハソイル (呉羽化学) を入れたポリエチレンポットに播種し、25 °C の恒温室において 24 時間の明条件下で発生させた。アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) を介したトランジェントアッセイには、播種後 30 から 35 日目の植物体の 6 から 8 葉を用いた。

#### 20 2. INF1 の調製

ベンサミアナ葉に処理するインフェスチン (INF1) は、*inf1* 遺伝子を含む FLAG-ATS ベクター (FLAG-INF1) を導入した大腸菌 (*Escherichia coli* 株 pBF53) で発現させた融合タンパク質を用いた (文献 6 2)。融合タンパク質の調製は以下のように行った。

25 それぞれの大腸菌を 50  $\mu$ g/ml アンピシリンを含む LB 液体培地中で 37 °C で一

- 晩振とう培養 (140 rpm) した。大腸菌培養液を 100 倍量の 50 ppm アンピシリンを含む LB 液体培地に加え、 $OD_{600} = 0.6$  になるまで 37 °C でさらに振とう培養 (140 rpm) した。最終濃度 1 mM となるように IPTG を添加してタンパク質の発現を誘導し、37 °C で 3 時間振とう培養 (140 rpm) 後、培養液を遠心分離 (5,000 x g、10 分間) した。上清をフィルター濾過後、透析チューブ (排除限界分子量 3,500) に移し、滅菌蒸留水に対して 4 °C で 24 時間透析した。以上の操作で得られた画分をタンパク質濃度が 10 mg/ml となるように調整し、FLAG-INF1 溶液とした。植物に処理をする際には、蒸留水で 3 倍に希釈した INF1 溶液を用いた。
- 10 3. GUS 遺伝子を連結した PVS3 プロモータを挿入したバイナリーベクターの構築
- MUG アッセイに用いる発現ベクターの構築は以下の様に行った。PVS3 ゲノムクローンを鋳型とし、制限酵素部位 (*EcoRI* または *ClaI*) を付加したプライマーを用いて (図 2 4)、推定プロモータ領域と PVS3 遺伝子コード領域開始部を含む塩基配列を PCR により増幅した。PCR には KOD -Plus- DNA Polymerase (Toyobo) を
- 15 用い、55 °C のアニーリング温度で、添付のプロトコールに従って反応を行った。この PCR 産物を *EcoRI* および *ClaI* で消化して 1% アガロースゲル電気泳動により分画した後、目的の DNA 断片を QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて精製し、インサートとして用いた。ベクターにはイントロンを含む GUS 遺伝子を含む pGreen 0229 (Hellens et al. 2000) を用い、インサートと同様に *EcoRI*
- 20 および *ClaI* で消化し 1% アガロースゲル電気泳動により分画した。目的の DNA 断片を QIAquick Gel Extraction Kit を用いて精製してベクターとして用いた。以上のように調製したベクターおよびインサートを、ベクター : インサートのモル比が 1:3 になるように調整し、DNA Ligation Kit ver. 2 (Takara) によりライゲーションした。E. coli JM109 Competent Cell (Takara) を、ライゲーションした
- 25 プラスミド DNA で形質転換した後、LB 寒天培地上 [1% tryptone peptone, 0.5%

yeast extract powder、1% NaCl、50  $\mu$ g/ml kanamycin、1% agarose] に接種し、37  $^{\circ}$ Cで一晩培養した。シングルコロニーを、カナマイシン溶液 (50  $\mu$ g/ml) を含む 2 ml の LB 液体培地 [1% tryptone peptone、0.5% yeast extract powder、1% NaCl、1% agarose] で 37  $^{\circ}$ Cで一晩培養し、プラスミド DNA を回収した。

5 図 2 5 に PVS3 プロモータを挿入したバイナリーベクターのマップを示した。

#### 4. ベンサミアナ葉におけるトランジェントアッセイに用いるデリションクローンの構築

上記 3 で作製した GUS 発現ベクターを鋳型とし、目的のデリションポイント  
10 から始まる制限酵素部位 (*Eco*RI または *Cla*I) を付加したプライマーを用いて (図 2 4)、推定プロモータ領域と PVS3 遺伝子コード領域開始部を含む塩基配列を PCR により増幅した。PCR には KOD -Plus- DNA Polymerase (Toyobo) を用い、55  $^{\circ}$ C のアニーリング温度で、添付のプロトコールに従った。バイナリーベクターの調製は上記 3 の操作に準じて行い、6 で述べる方法でアグロバクテリウムに導入し  
15 た。得られたデリションクローンの塩基配列が間違っていないことを確認した。

#### 5. StMEK1<sup>DD</sup> 発現ベクターの構築

ベンサミアナ葉における MUG アッセイに用いる発現ベクターの構築は以下の様  
に行った。5' 側非翻訳領域を含む StMEK1<sup>DD</sup> (文献 6 4) の塩基配列を、制限酵素  
20 部位 (*Apa*I または *Spe*I) を付加したプライマー (5'-TTGGGCCCATGCGACCTCTTCAAC  
CACC-3' : 配列番号 3 6, 5'-GACTAGTACAAAAGAGTGTGGAATTAC-3' : 配列番号 3 7)  
を用いて、PCR により増幅した。PCR 反応には KOD -Plus- DNA Polymerase (Toyo  
bo) を用い、55  $^{\circ}$ C のアニーリング温度で、添付のプロトコールに従って反応を行  
った。この PCR 産物を *Apa*I および *Spe*I で消化して 1% アガロースゲル電気泳動  
25 により分画した後、目的の DNA 断片を QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

を用いて精製し、インサートとして用いた。ベクターには $\beta$ -エストラジオールにより導入した遺伝子発現が誘導される pER8 (文献 7 4) を用い、インサートと同様に *Apa*I および *Spe*I で消化し 1% アガロースゲル電気泳動により分画した。

目的の DNA 断片を QIAquick Gel Extraction Kit を用いて精製してベクターとし

5 て用いた。以後は上記 3 のライゲーションの操作に準じて行った。

#### 6. アグロバクテリウムの形質転換

導入するベクターを TE で 10 ng/ $\mu$ l に調整し、アグロバクテリウムの形質転換に用いた。バイナリーベクターを 80  $\mu$ l のアグロバクテリウム GV3101 株の competent cell を氷上で融解して、2  $\mu$ l のベクター溶液を加えてピペットで混和し、  
10 30 分間氷上で静置した。この溶液をキュベットに移して、Micro Pulser™ (Bio-Rad) でエレクトロポレート ( $V = 1.44$  kV、 $T = 2.5$  kV/resistance、 $C = all\ out$ 、 $R = R5\ 129$ ) して、形質転換した。溶液を 1.5 ml のエッペンドルフチューブに移して、1 ml の SOC 培地 [2% tryptone peptone、0.5% yeast extract powder、0.05% NaCl、10 mM  $MgCl_2$ 、10 mM  $MgSO_4$ ] に加え室温で 1 時間静置した。その  
15 後、LB 寒天培地上 [1% tryptone peptone、0.5% yeast extract powder、1% NaCl、50  $\mu$ g/ml kanamycin、50  $\mu$ g/ml rifampicin、1% agarose] に接種し、28  $^{\circ}C$  で 2 日間培養した。シングルコロニーを回収し、下記 7 の Agroinfiltration 実験に用いた。

20

#### 7. ペンサミアナ葉を用いた Agroinfiltration による遺伝子の導入

Thomas ら (2000) の方法 (文献 4 1) に従い、Agroinfiltration を以下の方法で行った。バイナリーベクターを導入したアグロバクテリウムを所定の抗生物質を含む LB 液体培地中で 28  $^{\circ}C$  で 2 日間振とう培養した。培養液 2 ml を、抗  
25 物質を含む 8 ml の LB 液体培地に懸濁し、28  $^{\circ}C$  でさらに 3 時間振とう培養した。

懸濁液中のアグロバクテリウムの密度は、紫外可視分光解析システム (DU シリーズ 600、Beckman) を用いて測定し、波長 600 nm における吸光度で測定した。懸濁液を室温で遠心分離 (3,000 x g、15 分) し、沈殿を 150  $\mu$ M のアセトシリゴン、10 mM  $\text{MgCl}_2$  を含む 10 mM MES (pH 5.6) に  $\text{OD}_{600} = 0.5$  となるよう再懸濁した。

PVS:GUSint 保持したアグロバクテリウムを単独で Agroinfiltration する際は、 $\text{OD}_{600} = 0.5$  の懸濁液を葉に注入し、一日後に 10  $\mu\text{g/ml}$  の INF1 溶液を注入することで PVS3 プロモータを誘導した (図 2 6)。一方、pER8 ベクターを用いた XVE:StMEK1<sup>DD</sup> または PVS:GUSint 保持したアグロバクテリウムを Agroinfiltration する際は、それぞれ  $\text{OD}_{600} = 0.005$  および  $\text{OD}_{600} = 0.25$  となるように希釈し、20  $\mu$ M の  $\beta$ -エストラジオールで G10-90 プロモータの下流に連結した XVE (LexA、VP16、estrogen 受容体) システムを誘導して StMEK1<sup>DD</sup> を発現させた (文献 7 4)。対照区には、XVE:StMEK1<sup>DD</sup> の代わりに pER8 ベクターを用いて 20  $\mu$ M の  $\beta$ -エストラジオールを注入した (図 2 6)。

懸濁液を室温 (20 °C) で 1 時間静置した後、針のないシリンジを用いてベンサミアナ葉の細胞間隙に注入した。注入後植物体を 25 °C、24 時間明条件で静置し、下記 9 の MUG (4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-glucuronide) アッセイに用いた。

#### 8. ベンサミアナにおけるウイルス誘導型遺伝子サイレンシング

植物に感染したウイルス内の塩基配列が植物の遺伝子と相同な配列を含むと、植物内で遺伝子サイレンシング (virus-induced gene silencing; VIGS) が起こることが知られている (文献 6 7)。本実施例では、遺伝子サイレンシングが安定して起こる PVX とベンサミアナの系を用いた。PVX を含むバイナリーベクターである pGR106 に、SIPK の翻訳開始コドンより 230 bp の cDNA 断片、WIPK の翻訳開始コドンより 178 bp の cDNA 断片、または SIPK と WIPK をタンデムに連結した cD



NA 断片を挿入して得られた遺伝子サイレンシング用ベクターをアグロバクテリウムに導入した。上記 7 の方法に準じてアグロバクテリウムを培養し、播種後 3 週間のベンサミアナ葉に注入して 1 ヶ月生育させた上位葉を実験に用いた（図 2 7）。

5

### 9. MUG アッセイ

Gallagher (1992) の方法（文献 60）に従い、GUS 発現を定量するために MUG (4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-glucuronide) アッセイを行った。アグロバクテリウムを注入した 1 cm 平方のベンサミアナ葉 3 枚を液体窒素中で磨碎した後に 200  $\mu$ l の抽出緩衝液 [50mM NaHPO<sub>4</sub> (pH 7.0)、10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol、10 mM EDTA、0.1% sodium lauroyl sarcosine、0.1% TritonX-100] を加え、遠心分離 (12,000 rpm、4 °C、5 分) して上清を回収した。上記 13 のタンパク質定量の方法に従って抽出液のタンパク質濃度を測定し、10  $\mu$ l の抽出液を 37 °C の 90  $\mu$ l 蛍光測定緩衝液 [extraction buffer、2 mM MUG] に加えて反応液を 100  $\mu$ l とし、  
15 37 °C で 1 時間静置した。反応液を 900  $\mu$ l の反応停止液 (0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) に加え、測定に用いた。蛍光分光光度計 RF-5300PC (Shimadzu) を用いて、365 nm の励起光で、455 nm の放出スペクトルを測定した。検量線は 4-MU (7-hydroxy-4-methylcoumarin) を用いて作成し、測定値を 4-MU nM/min·mg protein に換算した。内在の GUS 活性を測定値から除外するため、酵素を熱変性したサンプルを準備し、  
20 換算値の差をとることで発現ベクターに由来する GUS 活性を算出した。

### 10. ベンサミアナ葉からの全 RNA 抽出

ベンサミアナ葉からの全 RNA の抽出は、SDS/フェノール法をもとに以下の方法で行った。ベンサミアナ葉 1 g を乳鉢中で液体窒素を加えながら磨碎し、抽出緩衝液 (EB) [50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM 塩化ナトリウム、5 mM EDTA、5 %

25

SDS] 5 ml、PCI [フェノール / クロロホルム / イソアミルアルコール (50: 4  
9:1、v/v/v) ] 0.4 ml、メルカプトエタノール 10  $\mu$ l の入った 50 ml 容滅菌遠心  
管に加え、1 分間激しく混合し、PCI 4.8 ml を加え軽く攪拌した。これを、ポリ  
トロン型ホモジェナイザー (HG30、日立) を用いて 2 分間磨砕した後、遠心分離  
5 した (1,300 x g、15 分)。水層 (上層) を新しい 50 ml 容滅菌遠心管に移し、PC  
I 6 ml を加えて 2 分間攪拌した後、再び常温で遠心分離した (1,300 x g、15 分)。  
水層 (上層) に 1/40 量の 4 M 塩化ナトリウムと 2 倍量のエタノールを加えて混合  
し、-20°C で 2 時間以上静置した後、遠心分離した (1,300 x g、15 分)。得られ  
た沈殿に再懸濁緩衝液 (RB) [50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM EDTA、0.5% SDS]  
10 2 ml を加え、15 分間穏やかに振蕩、懸濁した。懸濁液に 4 M 塩化ナトリウム 0.2  
ml とエタノール 4 ml を加え、-20°C で 2 時間以上静置した後、遠心分離した (1,  
300 x g、15 分)。得られた沈殿を冷 70 % エタノール 1 ml で洗浄した後、TE 緩  
衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA] 1 ml に懸濁後、エッペンドルチュ  
ープに移し、10 M 塩化リチウム 250  $\mu$ l を加えて、氷上で 1 時間静置した。懸濁  
15 液を 4°C で遠心分離し (22,000 x g、15 分)、RNA を沈殿として回収した。このリ  
チウム沈殿操作を 2 回繰り返し、得られた沈殿を TE 緩衝液 300  $\mu$ l に懸濁し、ク  
ロロホルム / イソアミルアルコール (24:1、v/v) 100  $\mu$ l を加えて激しく攪拌  
した後、4°C で遠心分離した (22,000 x g、15 分)。水層 (上層) に 1/10 量の 3  
M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) と 2 倍量のエタノールを加え、-20°C で 2 時間以上静  
20 置した後、遠心分離した (22,000 x g、5 分)。得られた沈殿を冷 70 % エタノー  
ルで洗浄した後 10 分間風乾し、TE 緩衝液 40  $\mu$ l に懸濁し、全 RNA とした。これ  
を RNA 試料として -80°C で保存した。

#### 11. ノーザン解析

25 全 RNA をホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動で分画した後 (文献 37)、

アルカリブロットティング法（文献 6 8）で Hybond-N<sup>+</sup>ナイロン膜（Amersham）に転写・固定した。

RNA を吸着させたナイロン膜を、42 °C のプレハイブリダイゼーション溶液 [50 %ホルムアミド、5 x デンハルト溶液（文献 3 7）、5 x SSPE（文献 3 7）、0.5 %  
5 SDS、100 μg/ml 熱変性サケ精子 DNA（Pharmacia）] 中で 1 時間以上放置した後、<sup>32</sup>P 標識 DNA プローブを添加し、42 °C 下で 16 時間以上ハイブリダイゼーションを行った。この膜を 0.1 % SDS 含有 4 x SSPE 中で室温下 15 分間（2 回）、0.1 %  
SDS 含有 4 x SSPE 中で 60 °C 下 15 分間、さらに 0.1 % SDS 含有 2 x SSPE 中で 60 °C 下 15 分間（1 回）順次洗浄した。オートラジオグラフィーは、X 線フィルム  
10 OMAT-AR（Kodak）および増感紙 Lighting Plus（Dupont）を用いて、-80 °C 下で行った。

## 12. プローブの作製

タバコの TEAS cDNA を組み込んだプラスミド pTEAS（Facchini and Chappel, 1  
15 992）を鋳型とし、プライマー（5' -GTCGACGACACAGCCACGTACGAGGT-3' : 配列番号 3 8、5' -ATCGATAGACTTTCTCCGGATGAGTG-3' : 配列番号 3 9）を用いて PCR により TEAS cDNA 断片を増幅した。反応は、TaKaRa Taq<sup>TM</sup>（宝酒造）およびインサート DNA を組み込んだプラスミド 2 ng を用い、DNA サーマルサイクラー（PJ2000、Perkin Elmer Cetus）で 94 °C - 1 分間（熱変性）、53 °C - 45 秒間（アニーリング）、  
20 72 °C - 2 分間（DNA 伸長反応）、25 サイクルという条件下で行った。0.8 % アガロース電気泳動により増幅された DNA 断片のサイズを確認した。QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルより DNA 断片を精製した。<sup>32</sup>P 標識 DNA プローブをランダムプライミング法（文献 1 7）により [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP（111 TBq/mm ol、ICN Biochemicals）および Megaprime DNA labelling system（Amersham）を用いて作製した。  
25

＜実施例 9＞ Agroinfiltration により導入された PVS3 プロモータデリーションクロンの INF1 に対する応答

P. infestans 由来のエリシタータンパク質である INF1 は、ベンサミアナに対して有効なエリシターである（文献 6 3）。イントロンを含む GUS 遺伝子を PVS3 プロモータの下流にインフレームで連結させたバイナリーベクターを Agroinfiltration によりベンサミアナ葉に導入し、INF1 誘導による GUS 活性を調べた（図 2 7）。PVS3 プロモータのほぼ全長を挿入したバイナリーベクター pPVS3-1 を導入した場合、水処理対照区に比べて著しい GUS 活性の増加が観察された（図 2 8）。  
10 INF1 に応答する PVS3 プロモータのシス配列を調べるために、デリーションクロンを作製してバイナリーベクターを構築して GUS 活性を調べた。その結果、-1337（pPVS3-2：配列番号 2 2）では INF1 応答性を保持していたが、-1287（pPVS3-3）までデリーションすると INF1 による GUS 活性誘導は顕著に減少した。この結果は、PVS3 プロモータのシス配列が pPVS3-2 と pPVS3-3 間の 50 bp（配列番号 2  
15 3）に関与することを示している（図 2 9）。

＜実施例 10＞ StMEK1<sup>DD</sup> による PVS3 プロモータの誘導

StMEK1<sup>DD</sup> は、MAPKK のアミノ酸置換による恒常活性型変異体であり、Agroinfiltration によりベンサミアナ葉に導入すると、SIPK および WIPK が誘導されることが確かめられている（文献 6 4）。INF1 処理に対する PVS3 プロモータ領域の応答領域が、StMEK1<sup>DD</sup> に対しても同様であるか否かを調べるため、イントロンを含む GUS 遺伝子を PVS3 プロモータに連結させたバイナリーベクターを Agroinfiltration によりベンサミアナに導入した。同時に  $\beta$ -エストラジオールにより誘導される XVE の下流に StMEK1<sup>DD</sup> 遺伝子を連結したバイナリーベクターを形質転換した  
25 アグロバクテリウムを共感染させ、 $\beta$ -エストラジオールを注入した後さらに 1

日静置して StMEK1<sup>DD</sup>を発現させて GUS 活性を調べた (図 2 7)。その結果、-1337 (pPVS3-2: 配列番号 2 2) では対照区に比べて  $\beta$ -エストラジオールを注入すると GUS 活性が誘導された (図 3 0)。一方、-1287 (pPVS3-3) まで PVS3 プロモータをデリーションすると  $\beta$ -エストラジオール処理による GUS 活性誘導は顕著に  
5 減少した。この結果は、pPVS3-2 と pPVS3-3 間の 50 bp (配列番号 2 3) に StMEK1<sup>DD</sup>に応答するシス配列に関与すること、および INF1 に対するシス配列と同様であることを示している (図 2 9)。

10 <実施例 1 1> StMEK1<sup>DD</sup>誘導による PVS3 プロモータ活性に及ぼす SIPK および WIPK サイレンシングの影響

SIPK、WIPK 単独または SIPK と WIPK 双方を遺伝子サイレンシングしたベンサミアナに Agroinfiltration により pPVS3-1 を導入して GUS 活性を調べた。この際、XVE の下流に連結した StMEK1<sup>DD</sup>を Agroinfiltration により共感染させた 1 日後に  $\beta$ -エストラジオールを注入し、さらに 1 日静置して StMEK1<sup>DD</sup>を発現させた (図  
15 3 1)。PVX 接種した対照植物に比べ、SIPK、WIPK をそれぞれサイレンシングした植物体においては顕著な GUS 活性の低下は観察されなかった (図 3 2)。一方、SIPK および WIPK 双方をサイレンシングした植物体においては顕著な GUS 活性の低下が認められた。

20 <実施例 1 2> StMEK1<sup>DD</sup>誘導による TEAS 発現に及ぼす SIPK および WIPK サイレンシングの影響

タバコのセスキテルペンシクラーゼである TEAS の制御機構を調べる目的で、SIPK および WIPK をサイレンシングしたベンサミアナに、StMEK1<sup>DD</sup> 遺伝子を 35S プロモータに連結させた発現ベクターを Agroinfiltration によりベンサミアナに  
25 導入し、経時的に全 RNA を抽出した。TEAS cDNA をプローブに用いてノーザン解

析したところ、SIPK と WIPK 双方をサイレンシングした区において顕著に TEAS mRNA の蓄積が抑制されていた (図 3 2)。この結果は、PVS3 プロモータの活性に対する SIPK および WIPK の役割が同様であることを示している。

- 5      以上の実施例に示したように、PVS3 遺伝子発現に重要なプロモータ領域を調べるために、GUS 遺伝子の上流に PVS3 プロモータを連結し、デリーションクローンを構築して、INF1 処理を施して GUS 活性を測定した (図 2 8)。デリーション pPVS3-2 (配列番号 2 2) では INF1 処理による顕著な活性増加が見られたが、デリーション pPVS3-3 では活性増加が認められなかった (図 2 8)。遺伝子の転写は、
- 10   刺激により生じた転写因子であるタンパク質がプロモータ領域中のシス配列に結合することにより誘導されることが知られている。デリーション pPVS3-2 と pPVS3-3 の間に転写因子と結合するシス配列が存在するものと考えられる。現時点では、この 50 bp の領域 (配列番号 2 3) には既知の制御モチーフを見出すことが出来なかった (図 2 9)。
- 15      タバコの MAPK である SIPK がセスキテルペノイドファイトアレキシン合成において重要な役割を果たす 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR) の発現を制御することが示されている (文献 7 3)。MAPK カスケードは、植物のシグナル伝達経路における重要な制御を司り、その下流に様々な防御反応を活性化することが知られている (文献 7 1)。さらに最近になって、StMEK1<sup>DD</sup> 遺伝子を 3
- 20   5S プロモータの下流に連結させた発現ベクターを Agroinfiltration によりベンサミアナに導入すると、TEAS が転写レベルで誘導されることが示された (文献 6 4)。INF1 処理に対する PVS3 プロモータの応答領域が、StMEK1<sup>DD</sup> に対しても同様であるか否かを調べるため、デリーションクローンおよび StMEK1<sup>DD</sup> を Agroinfiltration によりベンサミアナ葉に共発現させて GUS 活性を調べた。INF1 の場合と
- 25   同様に、デリーション pPVS3-2 では StMEK1<sup>DD</sup> による著しい活性増加が見られたが、

デリーション pPVS3-3 では有意な活性増加が認められなかった (図 3 0)。Zhang  
ら (1998) は *Phytophthora cryptogea* の生産する cryptogein エリシチンまたは  
*P. parasitica* の生産する parasiticein エリシチンでタバコ培養細胞を処理する  
と、SIPK および WIPK が活性化することを報告している (文献 7 2)。本実験結果  
5 と併せて考えると *P. infestans* の生産する INF1 エリシチンのシグナル伝達によ  
る PVS3 の誘導過程に、MAPK カスケードが関与する可能性を示している。この可  
可能性を調べる目的で、SIPK、WIPK または SIPK と WIPK 双方を遺伝子サイレンシン  
グしたベンサミアナ葉に PVS3 プロモータを含むバイナリーベクターを Agroinfil  
tration により導入し、INF1 エリシターで処理して GUS 活性を調べた (図 3 2)。  
10 PVX 接種した対照植物に比べ、WIPK または SIPK をサイレンシングした植物体にお  
いて僅かな GUS 活性の低下が認められるにとどまった。一方、SIPK および WIPK  
双方をサイレンシングした植物体においては、顕著な GUS 活性の低下が認められ  
た。これらの結果は、内在性のセスキテルペンシクラーゼである TEAS も SIPK お  
よび WIPK により制御されている可能性を示唆している。そこで、SIPK および WI  
15 PK をサイレンシングしたベンサミアナに、StMEK1<sup>DD</sup> 遺伝子をベンサミアナに発現  
させたところ、SIPK と WIPK 双方をサイレンシングした区においてのみ顕著に TE  
AS mRNA の蓄積が抑制されていた (図 3 2)。

Samuel と Ellis (2002) は、タバコ植物を高濃度のオゾンにさらすと SIPK およ  
び WIPK が活性化され、活性酸素生成を伴った細胞死が誘導されることを報告して  
20 いる (文献 6 9)。彼らは、RNAi (RNA 干渉) により SIPK をサイレンシングした  
形質転換植物をオゾンにさらすと、WIPK 活性が顕著に増高して細胞死が誘導され  
ることを見いだした。この報告を考慮すると、SIPK および WIPK が互いを相補す  
る形で下流の PVS3 遺伝子の発現を制御するものと思われる。

25 この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるもので

はない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

#### 産業上の利用の可能性

- 5 本発明によって提供される病原菌応答性プロモータは、植物細胞内において病原菌の感染時特異的に所望の遺伝子を発現させることに利用できる。従って、例えば防御応答に関与する遺伝子を用いることにより、病原菌の感染時において迅速な防御応答が行われる病原菌耐性植物の作出が可能となる。



## 請 求 の 範 囲

1. 以下の(a)～(c)のいずれかの DNA を含む病原菌応答性プロモータ、

(a) : 配列番号 1 で示される塩基配列からなる DNA、

5 (b) : 配列番号 1 で示される塩基配列において 1 若しくは複数の塩基が置換、欠失、挿入、又は付加された塩基配列からなり、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能する DNA、

(c) : (a)又は(b)の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能する DNA。

10

2. 以下の(A)～(C)のいずれかの DNA を含む病原菌応答性プロモータ、

(A) : 配列番号 2 で示される塩基配列からなる DNA、

(B) : 配列番号 2 で示される塩基配列において 1 若しくは複数の塩基が置換、欠失、挿入、又は付加された塩基配列からなり、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能する DNA、

15

(C) : (A)又は(B)の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能する DNA。

3. 以下の(1)～(3)のいずれかの DNA を含む病原菌応答性プロモータ、

20 (1) : 配列番号 1 で示される塩基配列内の連続した一部分からなり、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能する DNA、

(2) : (1)の DNA において 1 若しくは複数の塩基が置換、欠失、挿入、又は付加された塩基配列からなり、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能する DNA、

25 (3) : (1)又は(2)の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、植物

細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能する DNA。

4. 以下の(i)～(iii)のいずれかの DNA を含む病原菌応答性プロモータ、

(i) : 配列番号 2 2 で示される塩基配列からなる DNA、

5 (ii) : 配列番号 2 2 で示される塩基配列において 1 若しくは複数の塩基が置換、  
欠失、挿入、又は付加された塩基配列からなり、植物細胞内で病原菌応答性プロ  
モータとして機能する DNA、

(iii) : (i)又は(ii)の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、  
植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能する DNA。

10

5. 以下の(i)～(iii) のいずれかの DNA を含み、植物細胞内で病原菌応答性プロ  
モータとして機能する病原菌応答性プロモータ、

(i) : 配列番号 2 3 で示される塩基配列からなる DNA、

(ii) : 配列番号 2 3 で示される塩基配列において 1 若しくは複数の塩基が置換、  
15 欠失、挿入、又は付加された塩基配列からなる DNA、

(iii) : (i)又は(ii)の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする  
DNA。

6. 疫病菌の感染に対して特異的に応答する、ことを特徴とする請求の範囲第 5  
20 項に記載の病原菌応答性プロモータ。

7. 配列番号 2 3 で示される塩基配列からなる DNA。

8. 配列番号 2 3 で示される塩基配列の中の連続する 1 0 個以上の塩基配列から  
25 なり、病原菌応答性プロモータ活性を有する DNA。

9. 請求の範囲第 5 項に記載の病原菌応答性プロモータを含むベクター。

10. 請求の範囲第 8 項に記載の DNA を含むベクター。

5

11. 請求の範囲第 5 項に記載のプロモータと、及び該プロモータの制御下に連結される遺伝子であって、植物内で発現して該植物の防御応答を活性化する遺伝子と、を含む DNA コンストラクト。

10 12. 請求の範囲第 8 項に記載の DNA と、該 DNA と協同して病原菌応答性プロモータを構成する DNA と、構築された病原菌応答性プロモータの制御下に連結される遺伝子であって、植物内で発現して該植物の防御応答を活性化する遺伝子と、を含む DNA コンストラクト。

15 13. 前記遺伝子はその発現産物が植物の防御応答を制御する情報伝達経路を活性化する機能を有する、請求の範囲第 11 項に記載の DNA コンストラクト。

14. 前記遺伝子はその発現産物が SIPK 又は WIPK を活性化する機能を有する、請求の範囲第 11 項に記載の DNA コンストラクト。

20

15. 前記遺伝子は、恒常的活性型 MEK をコードする遺伝子である、請求の範囲第 11 項に記載の DNA コンストラクト。

16. 請求の範囲第 11 項に記載の DNA コンストラクトで宿主植物を形質転換して得られた形質転換体。

25

17. 前記宿主植物がナス科に属する植物である、請求の範囲第16項に記載の形質転換体。

- 5 18. 前記宿主植物がジャガイモ属に属する植物である、請求の範囲第16項に記載の形質転換体。

19. 以下のステップを含む、形質転換植物の作出方法、

- 請求の範囲第11項に記載のDNAコンストラクトで宿主植物を形質転換するステップ。  
10

20. 以下のステップを含む、宿主植物に病原菌耐性を付与する方法、

- 請求の範囲第11項に記載のDNAコンストラクトで宿主植物を形質転換するステップ。  
15

21. 請求の範囲第5項に記載の病原菌応答性プロモータが外来的に導入されている植物。

22. 請求の範囲第8項に記載のDNAが外来的に導入されている植物。

Fig.1

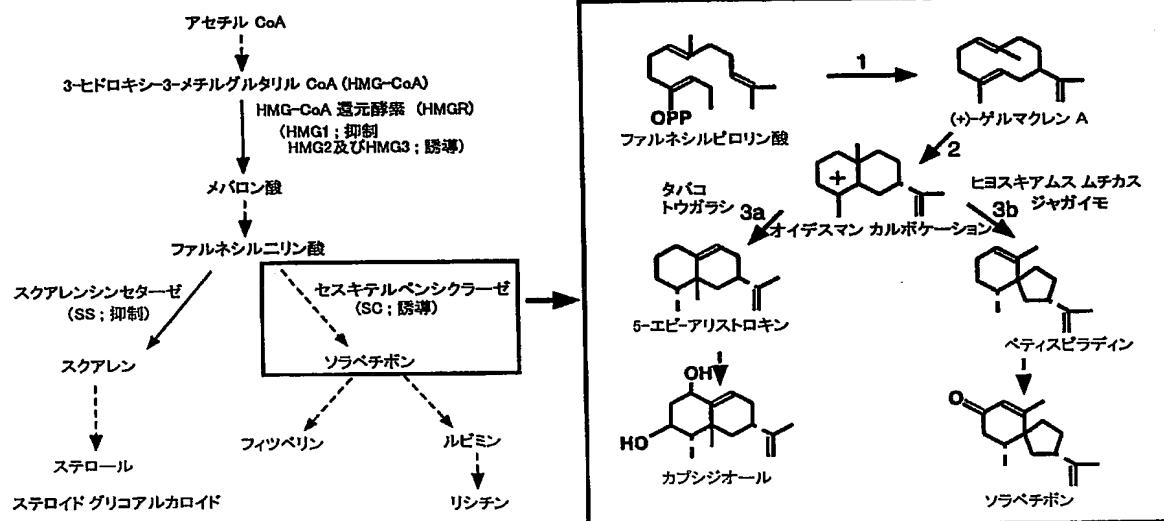


Fig.2

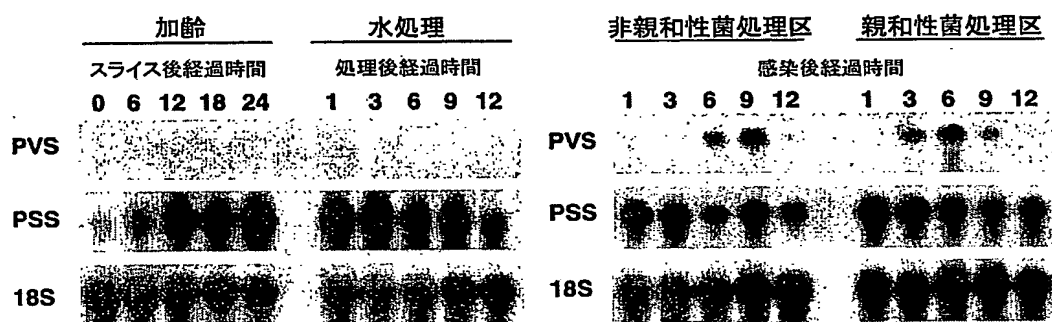
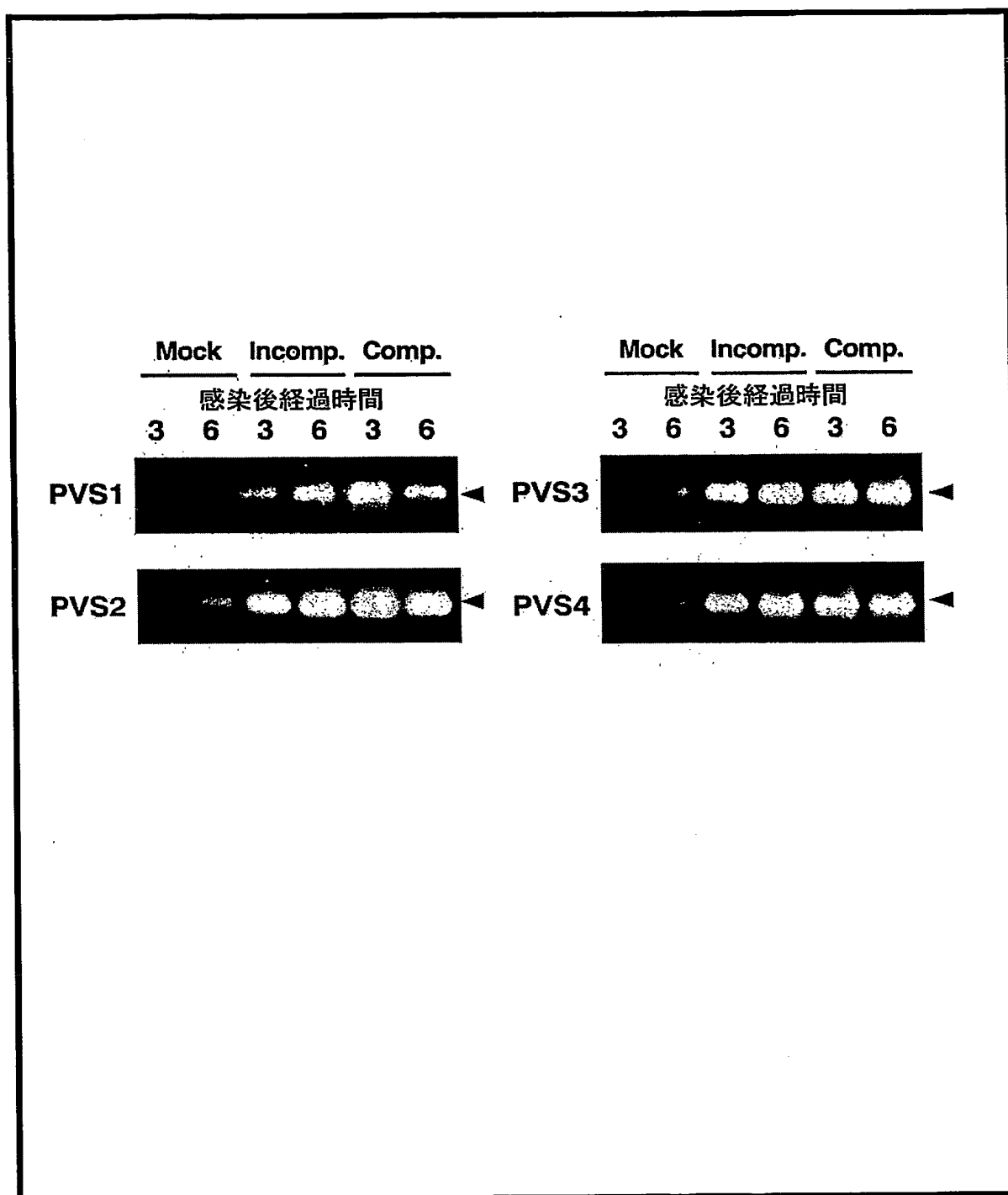


Fig.3



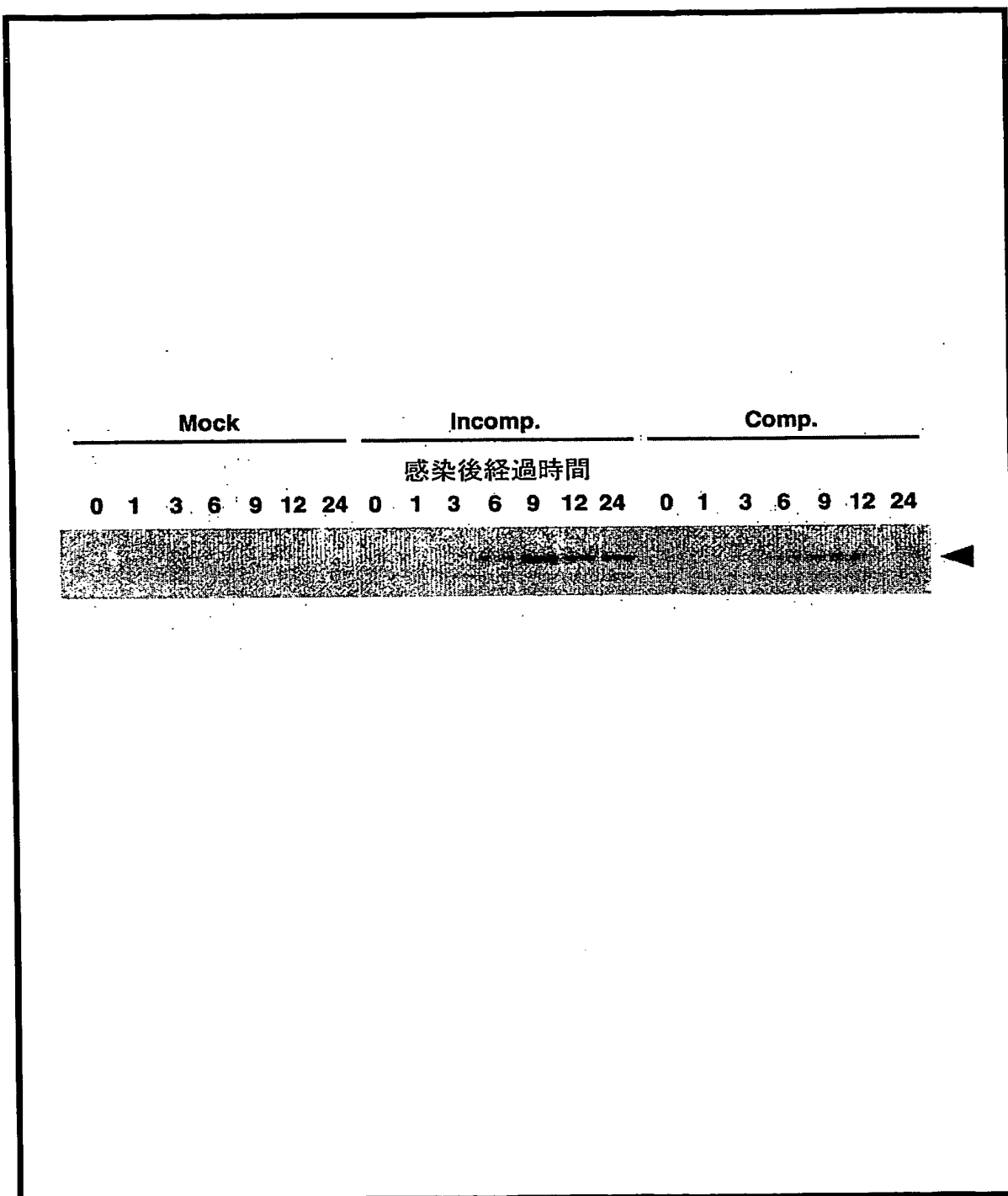




Fig.5

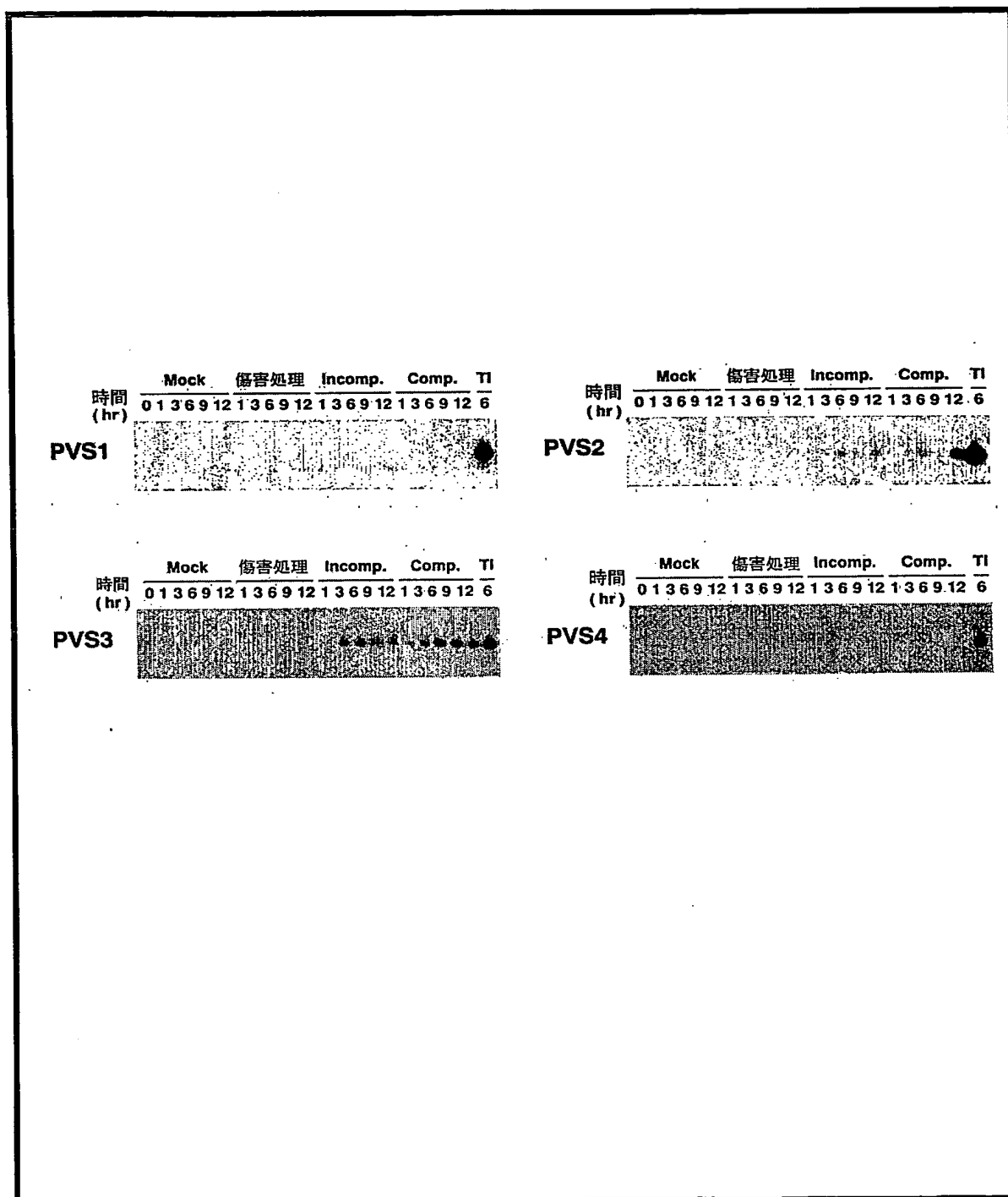


Fig. 6

-2648 ctcttctgttgatgtgctatagtccttttatatagcgtctattcatgttgtaatttggcc -2589  
 -2588 tctactttaatttttttcaacctaaaccaacgtacaataatgtgtaagtataactaatttg -2529  
 -2528 actcacataatagcatgggtgctagaagagtcacttgaaagagtatactgaagagtattaa -2469  
 -2468 aaatataattcctaaagaatttccgaagattcaattataattgatcaagaaggtgataagag -2409  
 -2408 cctttonacaacaacgtaaagtttgggtagcctctatanatgactatgaaaatagccaaaa -2349  
 -2348 aaaaattcaaatcgaattcctgttaactccttatttaggtatttgcgacctcactgtg -2289  
 -2288 ggtgccttacttgactaaatatttgattaaacattaatttttgggtcagtggtatatacatg -2229  
 -2228 ccaactcaatttttaataaatttagtgatcccttaccgatcttaaaaaaattgtattttgtg -2169  
 -2168 tgttaattgcaactttgggtcaaatgtcctaataataaagatttaattccaacagtattag -2109  
 -2108 aattttatttctaaagatcactcttaccgtcttaccactgaaagattaaaattctaaccaa -2049  
 -2048 gaatttgaacttttaataagtacttatgaatttttacttgcggttggaattttatgtacatg -1989  
 -1988 cttagaataattaggtcctcatgtagtcactttaagaaaattacaatgttacgttctaa -1929  
 -1928 caagaacaaatttgactctagatttttaatttttttttttaaaaaaaactaaatactc -1869  
 -1868 atccgattcaatttggttgaaactatgttcccaatttattatccgtttcaaaaaacaattgtt -1809  
 -1808 acattcagatattttaaatacaattaaactttaaatttctcatcatcagtaagaagttttaat -1749  
 -1748 aatcacatgaaggaagcctgttgggagaagttatgcgtaaaattatgcataatctctct -1689  
 -1688 tccattggaattagttacatctggatttgcataaaatcaacatttagttaaatacagatggc -1629  
 -1628 tttagatgattgaactttgaacaggaataaagcgtgcaataaagccatcaactcttgaac -1569  
 -1568 tttagaataatataatataaattcaataagttactttatttgggaatagctatagtgacggc -1509  
 -1508 ggatttagaattttcattaaagggactctaaaaaaatatagtgccctaaagatttgaacttg -1449  
 -1448 aaactcaagatgccactaaacaactcttaacttaccattcagaaggttcaaaaatcaatat -1389  
 -1388 atatagacataaatttttaatttttttaacctccctcgactacctctaggtccgcct -1329  
 -1328 tactattcccatccgatctcttgggaagcgggggagaaaaatttataatagtgcaactcat -1269  
 -1268 gctataaattacataactaagattttatgtaatgctatatttttcaagttgaagacggaaa -1209  
 -1208 caatagcattggatcgaagacagacgccattgaaggaagaaaaaacctaaaaaaataaaca -1149  
 -1148 aaaggagagacactttcttgggtcccttcgagggccatataatcccatataatataaaaaata -1089  
 -1088 aaacaaaaaaaagacagacgggtgcgcaaggaaggaagggcagctactaacggctaa -1029  
 -1028 ccctaactacaaataatgtaattttccaaaaacggaaactataaggaataaaaaacatgaa -969  
 -968 gattttgagtatttataatttttaaaagacagacggcactcgaggaaataaggaatcac -909  
 -908 agggagtaagaaagaaattaaaggcagctacagtatcatataataataaatttaagttt -849  
 -848 ggttgcatggaatttatatagtttttaaaaaaaataaatttgcacaaataacttgtcc -789  
 -788 aatttagaaaatctaaaagataatttattattttgtgttggttttacctcaacatctaatt -729  
 -728 acatttctcaaatatttaattttaaataatataaaaaaggttaataatattactctta -669  
 -668 ttattttatttattgtttctttaaagatttgcaggtcaataataaataactatogttgaat -609  
 -608 taagggagtagcatcaagaaattgatttataacacgatgggggtggaggagctagaaa -549  
 -548 gtttagtacaatttgggtgcactaagtacttcatccgtctcaatttatgagattttgttt -489  
 -488 taatcgagacgaatttataaagatgatttttttaagttgtaattcaaaacaaagtcatt -429  
 -428 aaatatttgcactcactataaattctcattaaatgtaaatgaatatttttagctaaatta -369  
 -368 ttactactccctccatgtccatattagttgatcatcttactatataaactgtccacct -309  
 -308 tactcaattataaaaaatattaattaaagtttttctatactagatataaaaatgttattat -249  
 -248 tatttttgataaagactagaaagagtatactatttgtatatctacagtgaggacgaccagt -189  
 -188 taagtataattgtagtcagaagtaaggcaacggatggactgcagtcacacaaaggctctc -129  
 -128 accactataaatactcaatattccttctcttccattccatcaacaccttcaccaactaa -69  
 -68 caaattaaaagaagaaaaaaatctctcagtttccctcacaaagctaaattagaccggtt -9  
 -8 ccgaagaaATGGCCCTAGCTATCCCTTTAACAATGAAGAGGAGATTGTTCCGCCCTGTTG 52  
 1 M A L A I P F N N E E E I V R P V 17  
  
 53 CCAATTTCTCTCAAGTCTTTGGGGTGATCGTTTCCATTCTCTCTCGACAATCAGg 112  
 18 A N F S P S L W G D R F H S F S L D N Q 37  
  
 113 taattacttaattaattactaattaaatccttctctatogcttatatttgggttaattact 172  
 173 actaatcccaatcatgaacatttttacagGTTGCTGAAAAGTATGCTCAAGAGATTGAAC 232  
 38 V A E K Y A Q E I E T 48  
  
 233 TTGAAGGAACAAACAAGGAGTTTGTGTCTGCTGCTGCTGTTGGAATAACATTGGCTGA 292  
 49 L K E Q T R S L L S A A A C G I T L A E 68  
  
 293 GAAATTGAATCTGATAGACATTGTTGAGCGCCTTGGCTTAGCTTATCATTTTGAGAAACA 352  
 69 K L N L I D I V E R L G L A Y H F E K Q 88  
  
 353 AATAGATGATATGTTGGATCAAAATTACAAAGCAGATCCCAACTTTGACGCTCATGATT 412  
 89 I D D M L D Q I Y K A D P N F D A H D L 108  
  
 413 AAACACTTTATCCCTTCAATTTTCAATATTAAGACAACATGGTTACAATATCTCCCAAag 472  
 109 N T L S L Q F R I L R Q H G Y N I S Q 127  
  
 473 taggtccatcattttaaacaattcaccaaaataaactggttttttctgcatgaaaactaa 532  
 533 ttatcttttgccttttattcgatcatgatccagAATTTTTCAGCAGATTCCAAGATGCGAA 592  
 128 K F F S R F Q D A N 137  
  
 593 TGGCAAGTTCAAGGAATGTCTTAGCAACGACATCAGGGGTCTATTGAACTTATACGAAGC 652  
 138 G K F K E C L S N D I R G L L N L Y E A 157  
  
 653 TTCACATGTAAGGACTCATGGAGAAGATATTTTGAAGAGGCACCTTGTTTTCTCCACTGC 712  
 158 S H V R T H G E D I L E E A L V F S T A 177  
  
 713 TCATCTTGAGTCTGCAGCTCCACATTTGGAGTCACCTCTGAGTAAGCAAGTGACTCATGC 772  
 178 H L E S A A P H L E S P L S K Q V T H A 197

Fig. 7

773	CCTTGAGCAGTCTCTCCATAAGAGCATTCCAAGAGTCGAGACGGCGCTACTTCATCTCCAT	832
198	L E Q S L H K S I P R V E T R Y F I S I	217
833	CTACGAAGAGGAGGAATTTAAGAATGATGTGTGCTTCGATTTGCCAAATTGGATTACAA	892
218	Y E E E E F K N D V L L R F A K L D Y N	237
893	CTTACTCCAGATGTTGCACAAACACGAACCTTAGTGAAGTATCAAGgtatacagatgtgtt	952
238	L L Q M L H K H E L S E V S R	252
953	aagttgaattaaaaataactagtataaattatttgttgatagtaatttctaagattggtac	1012
1013	ttattttgtagGTGGTGGAAAGATTTGGATTTGTGACAAACGCTTCCATATGCTAGGGAT	1072
253	W W K D L D F V T T L P Y A R D	268
1073	AGAGCAGTGGAAATGTTACTTTTGGACGATGGGAGTGTATGCTGAACCTCAATACTCTCAG	1132
269	R A V E C Y F W T M G V Y A E P Q Y S Q	288
1133	GCTCGTGTATCCTTGCAGAACTATAGCAATGATTTGCGATAGTAGACACATTCGAT	1192
289	A R V I L A K T I A M I S I V D D T F D	308
1193	GCTTATGGAATAGTAAAAGAACTTGAGGTCTACACCGATGCCATACAAAGgtatggactt	1252
309	A Y G I V K E L E V Y T D A I Q R	325
1253	gcctctccaaacagttcatggatttattagacgggaaacttaactaaatctctttctgtttt	1312
1313	attagGTGGGATATTAGTCAAATTGATCGACTCCAGAAATACATGAAAGTTAGTTTAAAG	1372
326	W D I S Q I D R L P E Y M K V S F K	343
1373	GCTCTTTTGGATCTCTATGAAGATTATGAAAGGAGTTGTCAAAGGATGGCAGATCCGAT	1432
344	A L L D L Y E D Y E K E L S K D G R S D	363
1433	GTTGTCCACTACGCAAAAGAAAGataggactcactgatttctatttaaaaacacttgta	1492
364	V V H Y A K E R	371
1493	tttaccttataactatttctttattatacaattagatctgttatgggagtattgatggttg	1552
1553	aatgtcttgtggtttctgttaaacagATGAAGGAGATTGTGAGAACTATTTTGTAGAAG	1612
372	M K E I V R N Y F V E	382
1613	CAAAGTGGTTCATTCAGGGATATATGCCGCTGTTTCTGAGTATCTTAGCAATGCATTAG	1672
383	A K W F I E G Y M P P V S E Y L S N A L	402
1673	CTACCAGCACATATTACTTGCTAACTACAACATCCTATTGGGAGTGAAGTCAGCAACAA	1732
403	A T S T Y Y L L T T T S Y L G V K S A T	422
1733	AGGAAGATTTTGAATGGTGGCTACGAACCTAAAATTCTTGAAGCCAATGTGACATTAT	1792
423	K E D F E W L A T N P K I L E A N V T L	442
1793	GCCGAGTTGTTGATGACATAGCAACGTATGAGgtaattagcatcgattacactacataa	1852
443	C R V V D D I A T Y E	453
1853	atcatcttataaatttagagttacagtaatttaatacaaaattgatttcacatacttataaa	1912
1913	tgaattataaattgccattccagGTGAGAGGGTAGGGGCCAAATCGCAACAGGAATTGA	1972
454	V E K G R G Q I A T G I E	466
1973	GTGTTATATGAGGGATTATGACGTATCAACAGAAGTAGCAATGGAAAAATCCAAGAGAT	2032
467	C Y M R D Y D V S T E V A M E K F Q E M	486
2033	GGCTGAGATAGCATGGAAGGATGTAAATGAAGGAATCTTCGACCAACACCTGTCTCTAC	2092
487	A E I A W K D V N E G I L R P T P V S T	506
2093	AGAAATTCCTTACTCGCATCTCAATCTTGCTCGTATTATAGATGTCACTTACAAGCACAA	2152
507	E I L T R I L N L A R I I D V T Y K H N	526
2153	TCAAGATGGATACACTCATCCCGAAAAAGTTCTAAAACCTCACATCATTTGCTTTACTGGT	2212
527	Q D G Y T H P E K V L K P H I I A L L V	546
2213	GGACTCCATTGAGATCtaaaaaatttagtaatttttaatttttaaaatgttacgtaaaaaa	2272
547	D S I E I *	551
2273	taataaacctgtaaaaaataatgaagattaaggcgaacgaaccagtgaggcggaacgttg	2332
2333	agaatggatgatggaaaatagatgaatatattgttatgcatgaaggggtgttcacactct	2392
2393	tttgattttgggaatgcatggacatccgcatgttgtcgactacacctcgaccaatgttgc	2452
2453	gcaagccacggccgatgccccagggccacggatgaccgttgtgtgcagtcgaagggcgat	2512
2513	gcgcccgaggccagggcgatgtcgactgaccgttgtgtgcagtcgaagggcgatgccccg	2572
2573	aggccacgtccgacgt	2588

Fig. 8

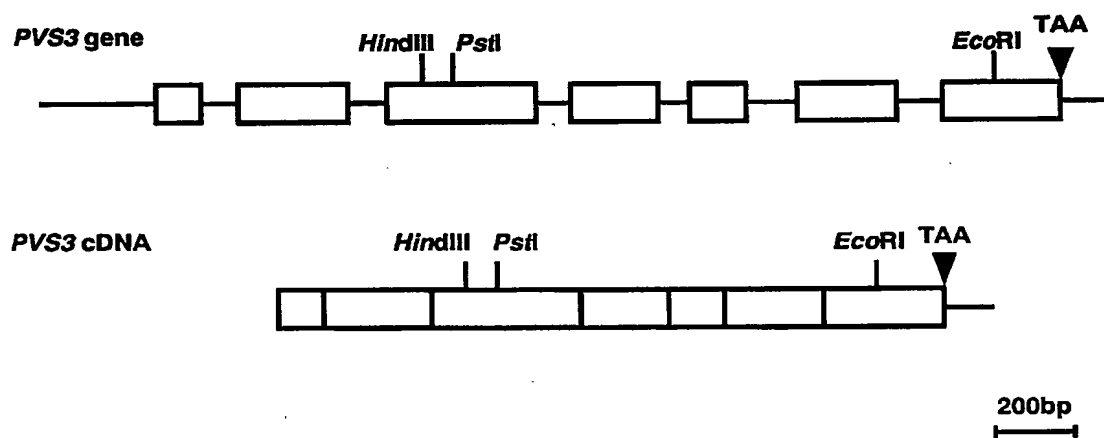


Fig. 9

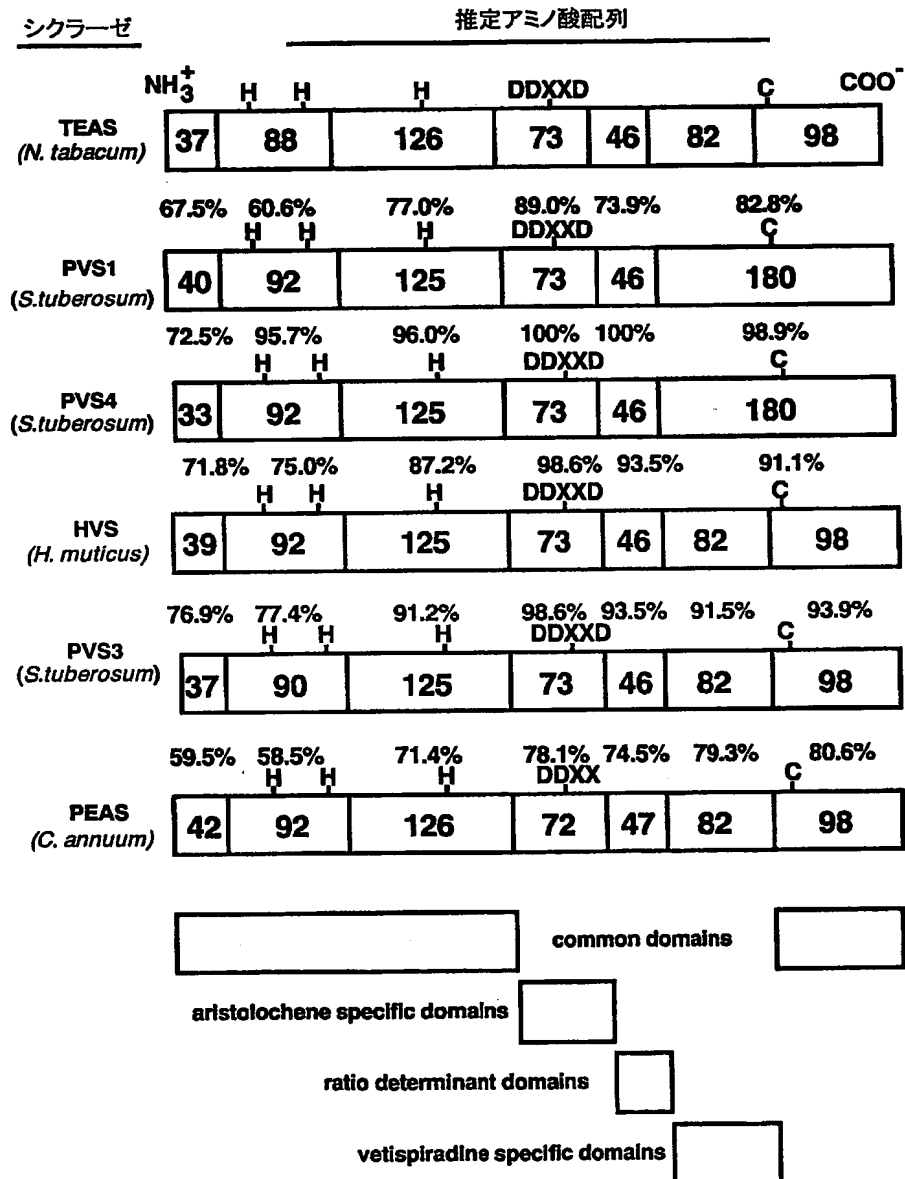


Fig. 1 0

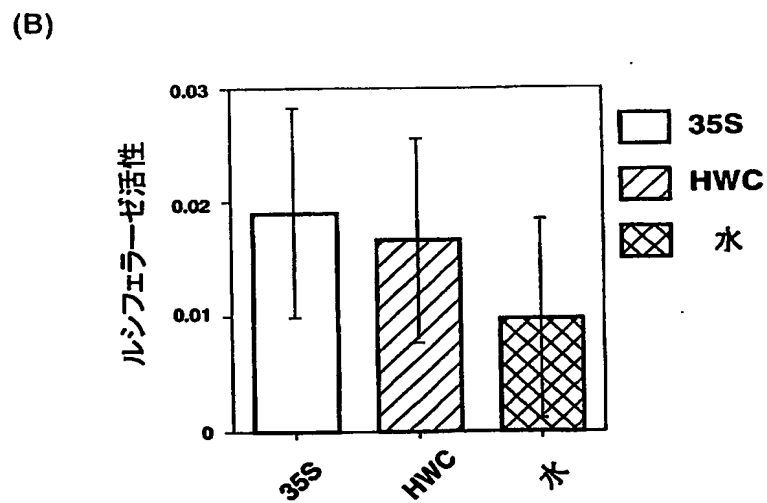
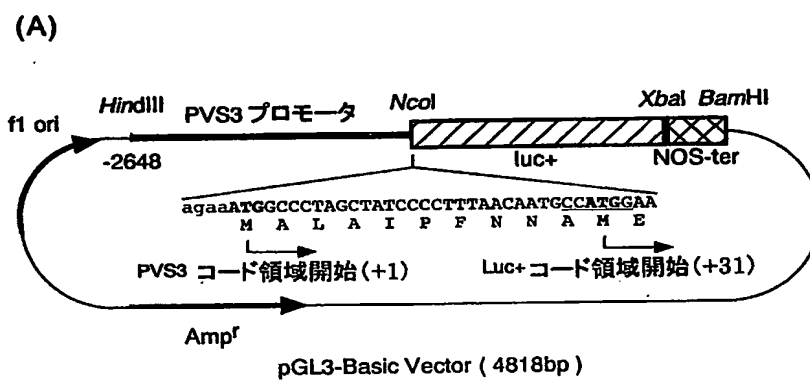


Fig. 1 1

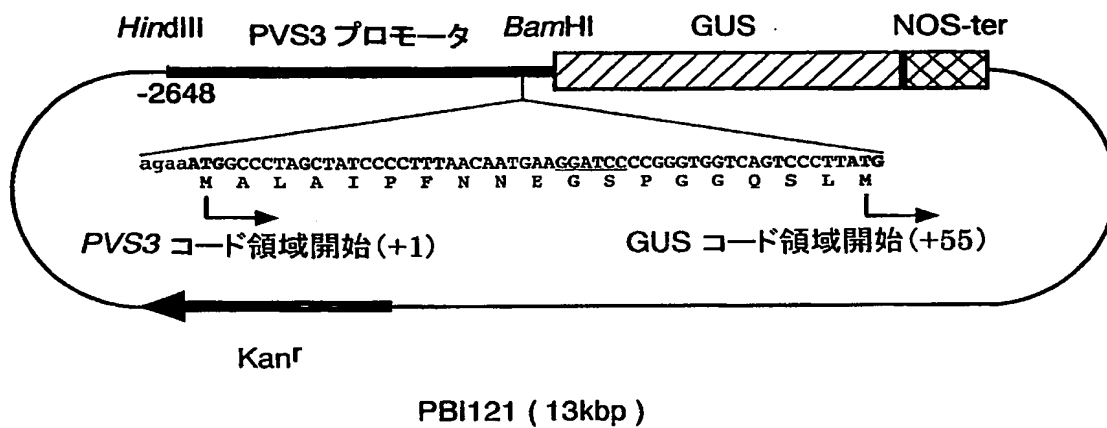


Fig. 1 2

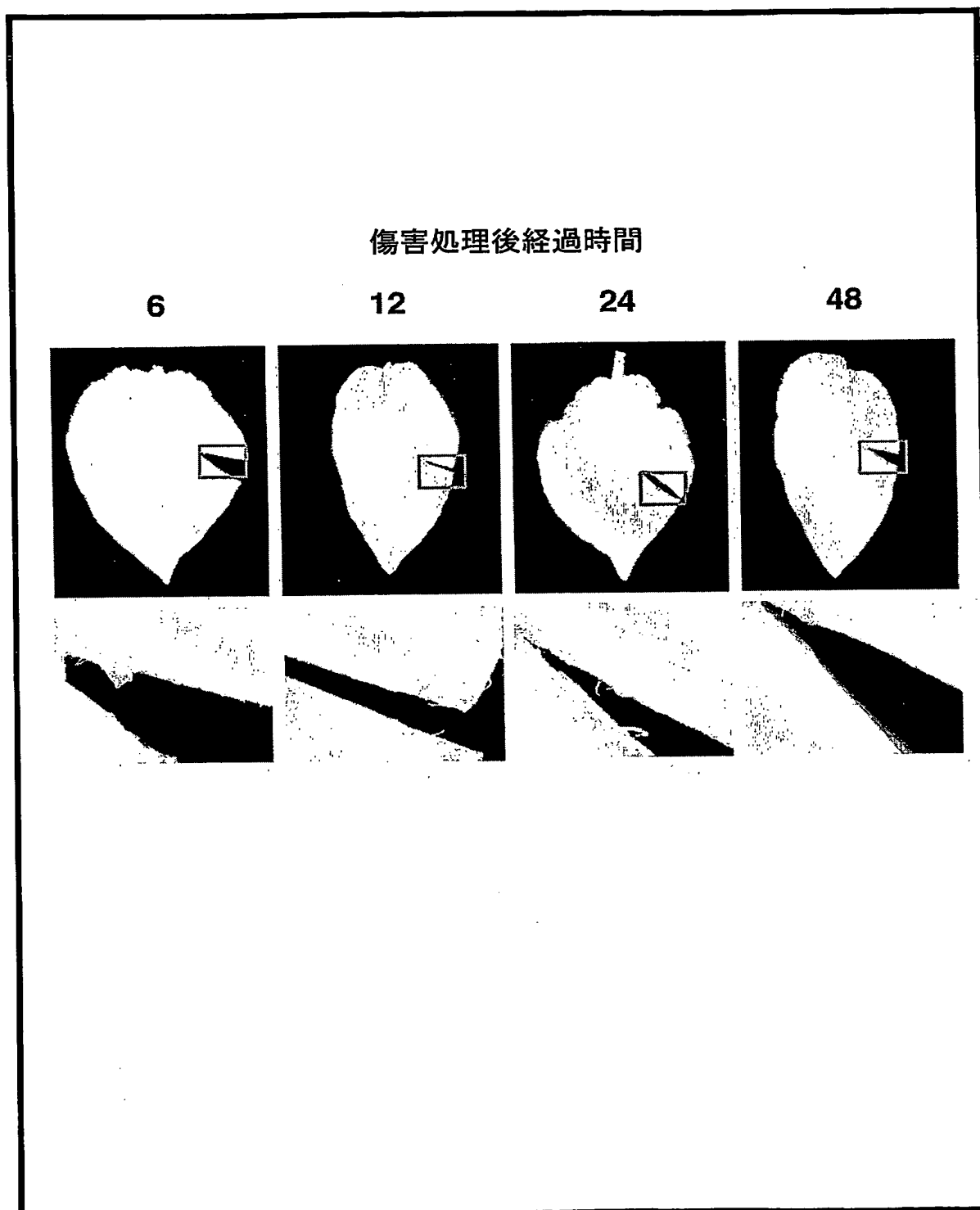




Fig. 1 3

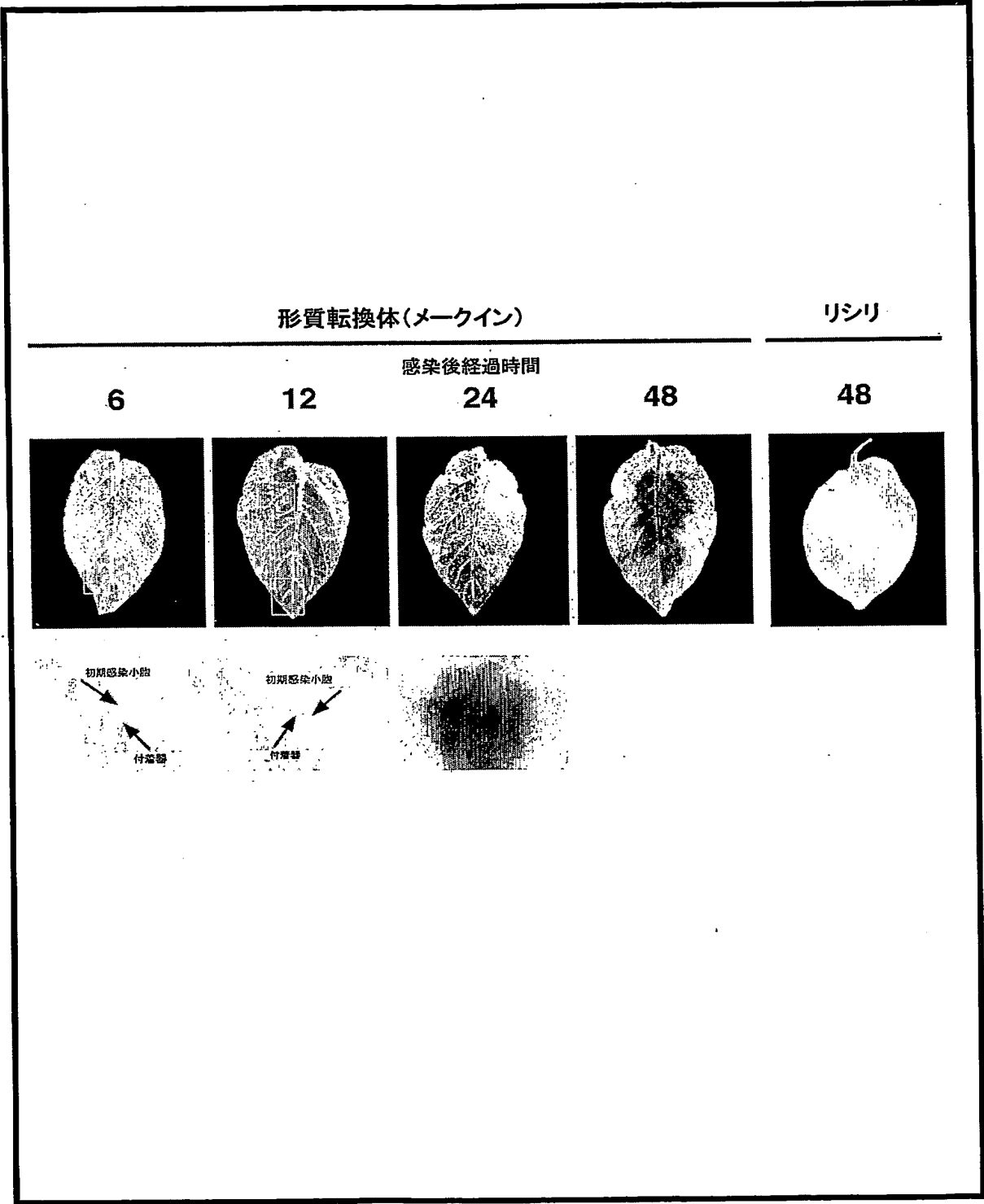


Fig. 1 4

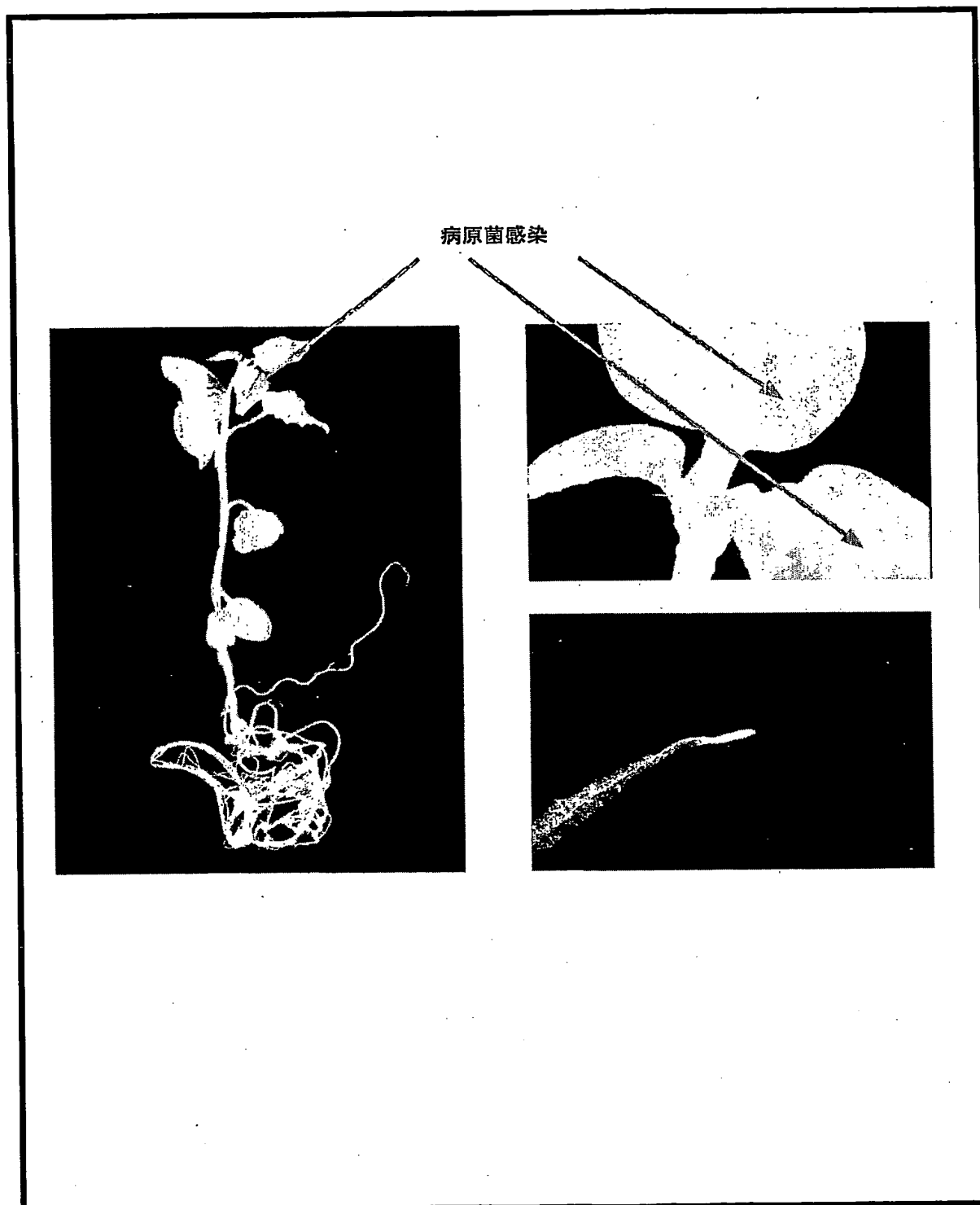


Fig. 1 5

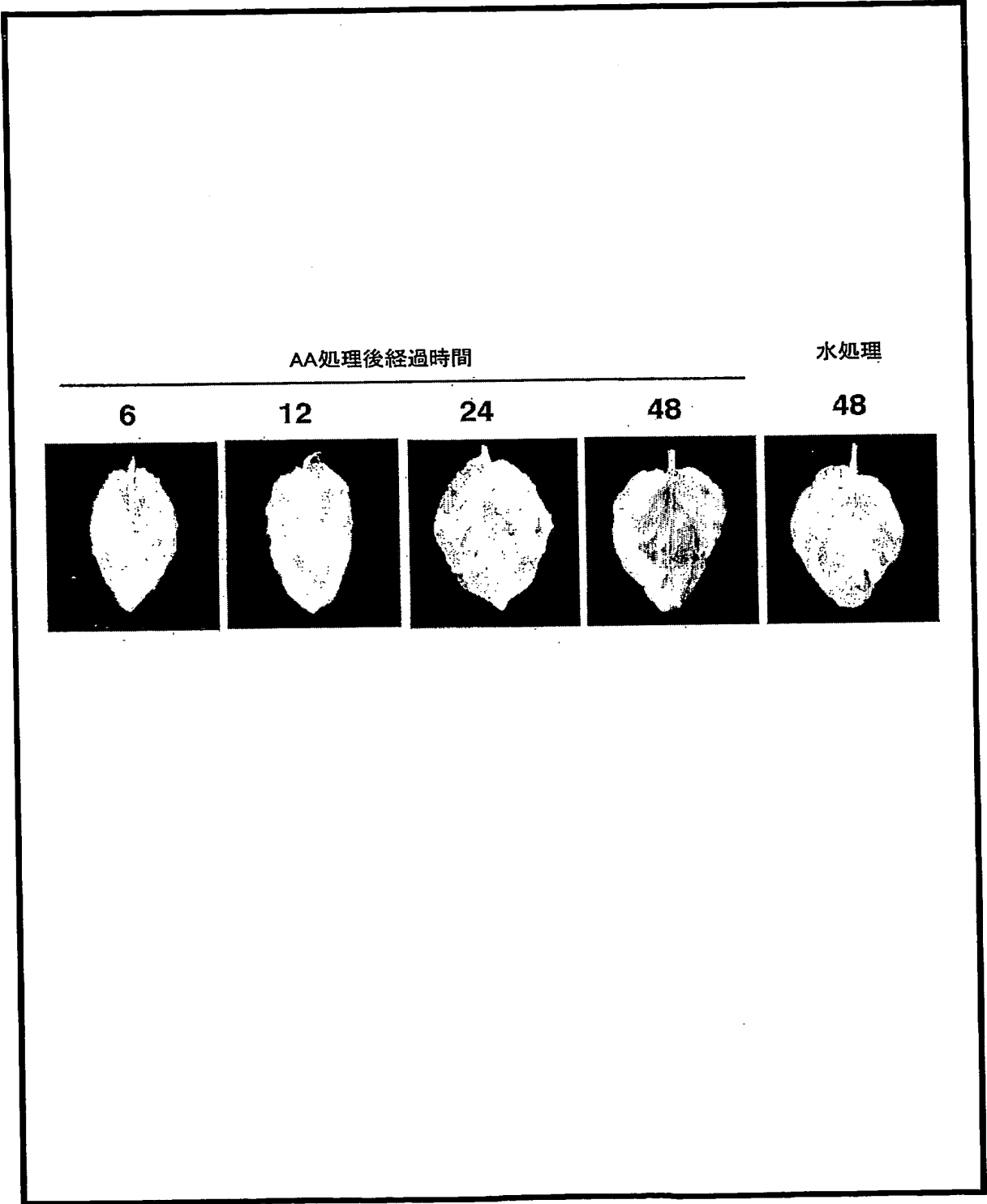


Fig. 1 6

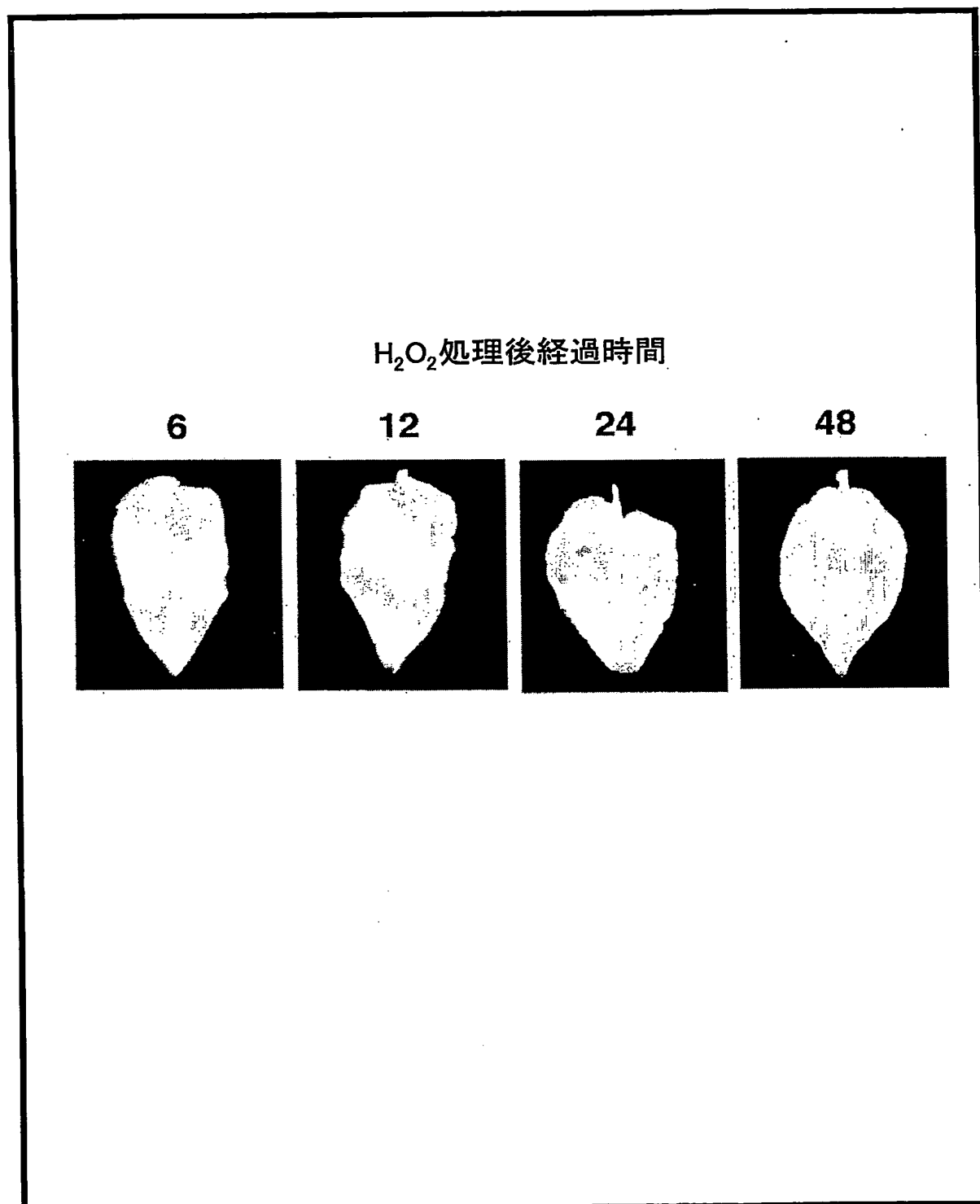
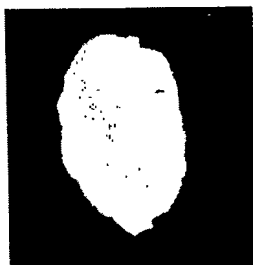


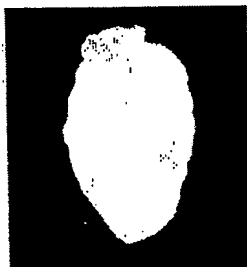
Fig. 1 7

グルコース及びグルコースオキシターゼ処理後経過時間

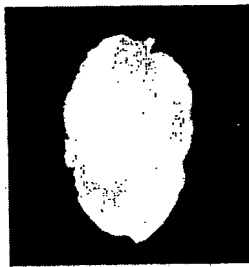
6



12



24



48

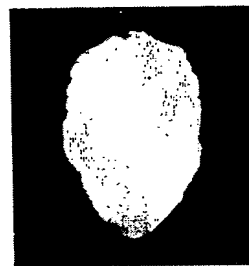


Fig. 1 8

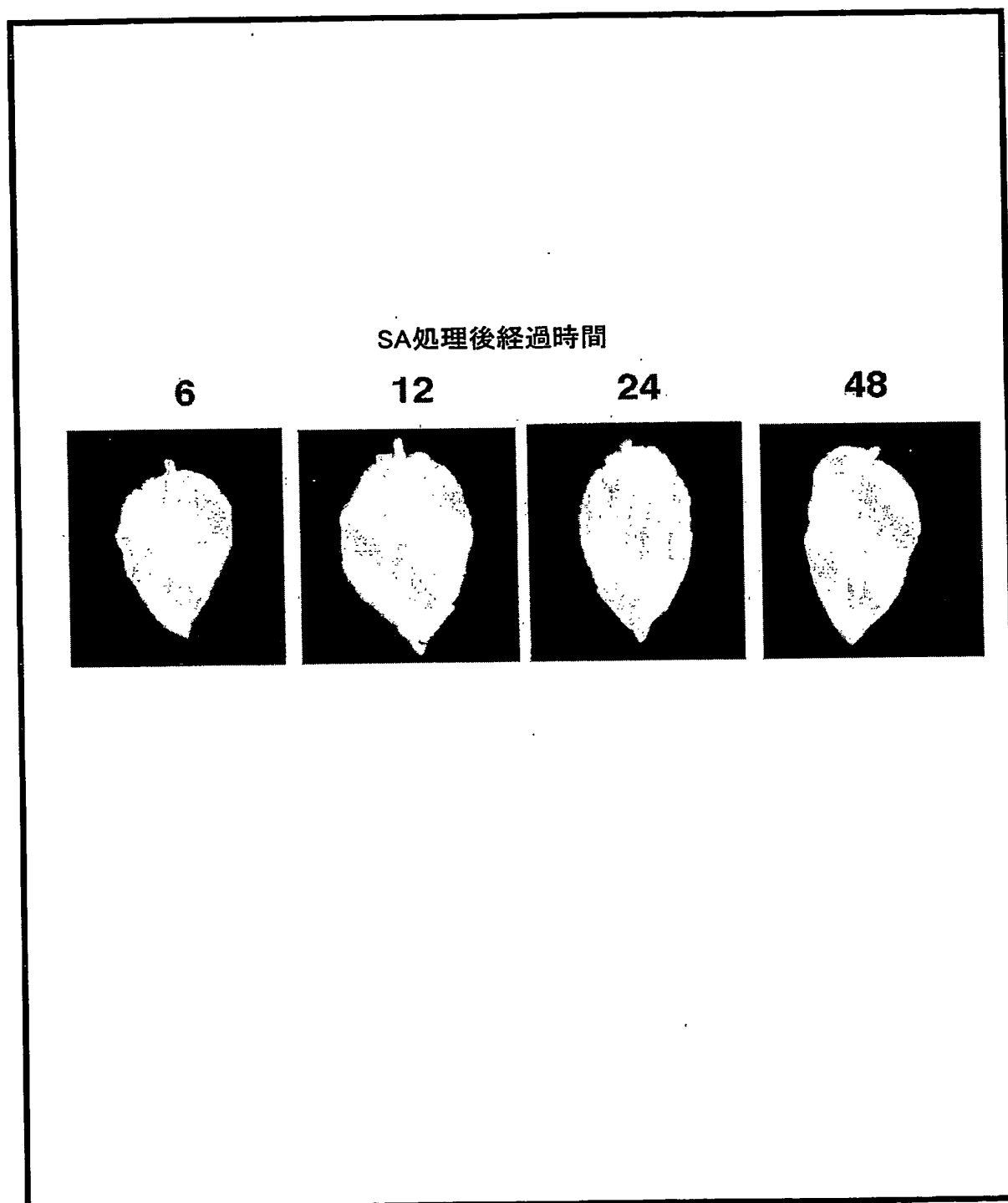


Fig. 1 9

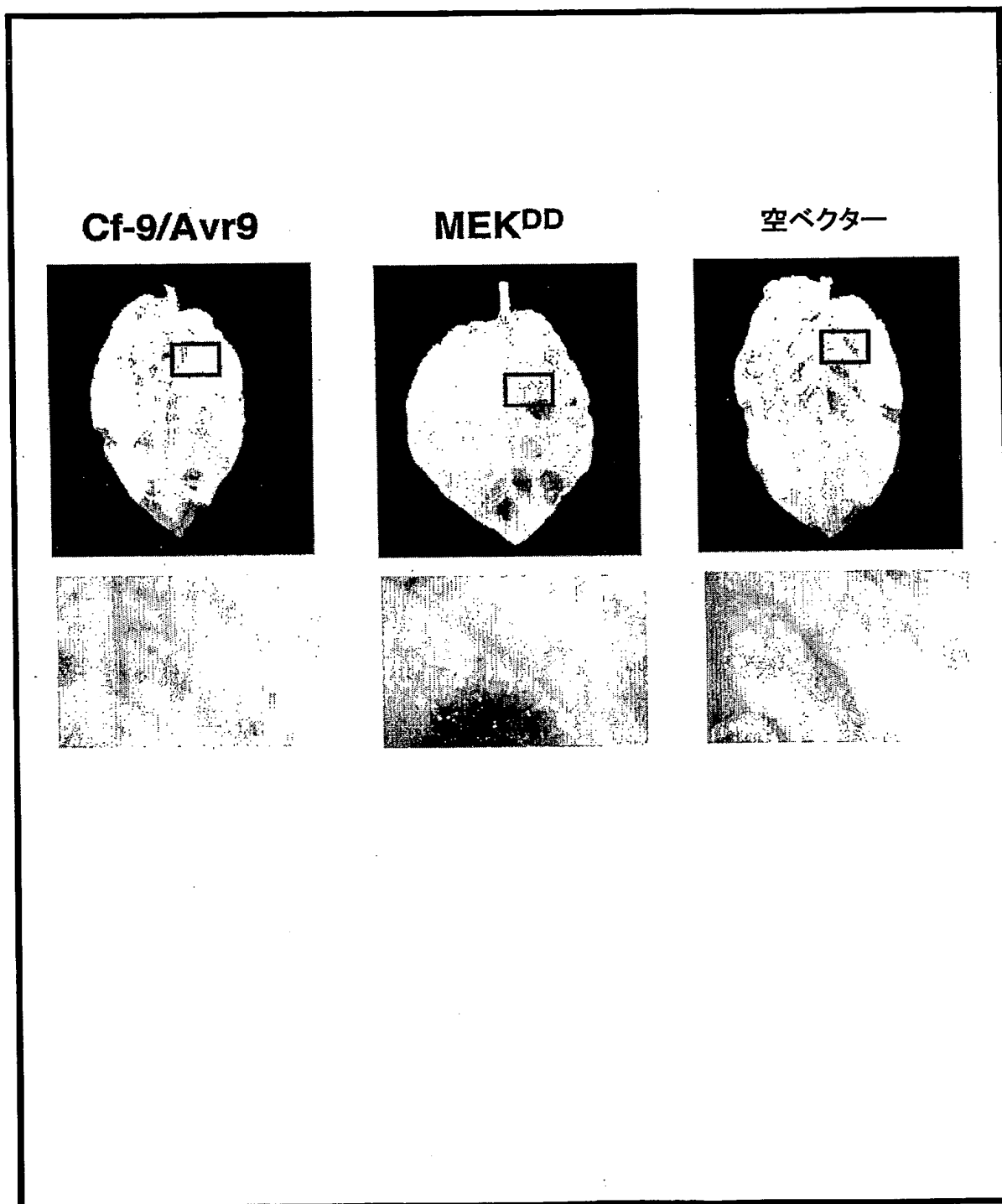


Fig. 2 0

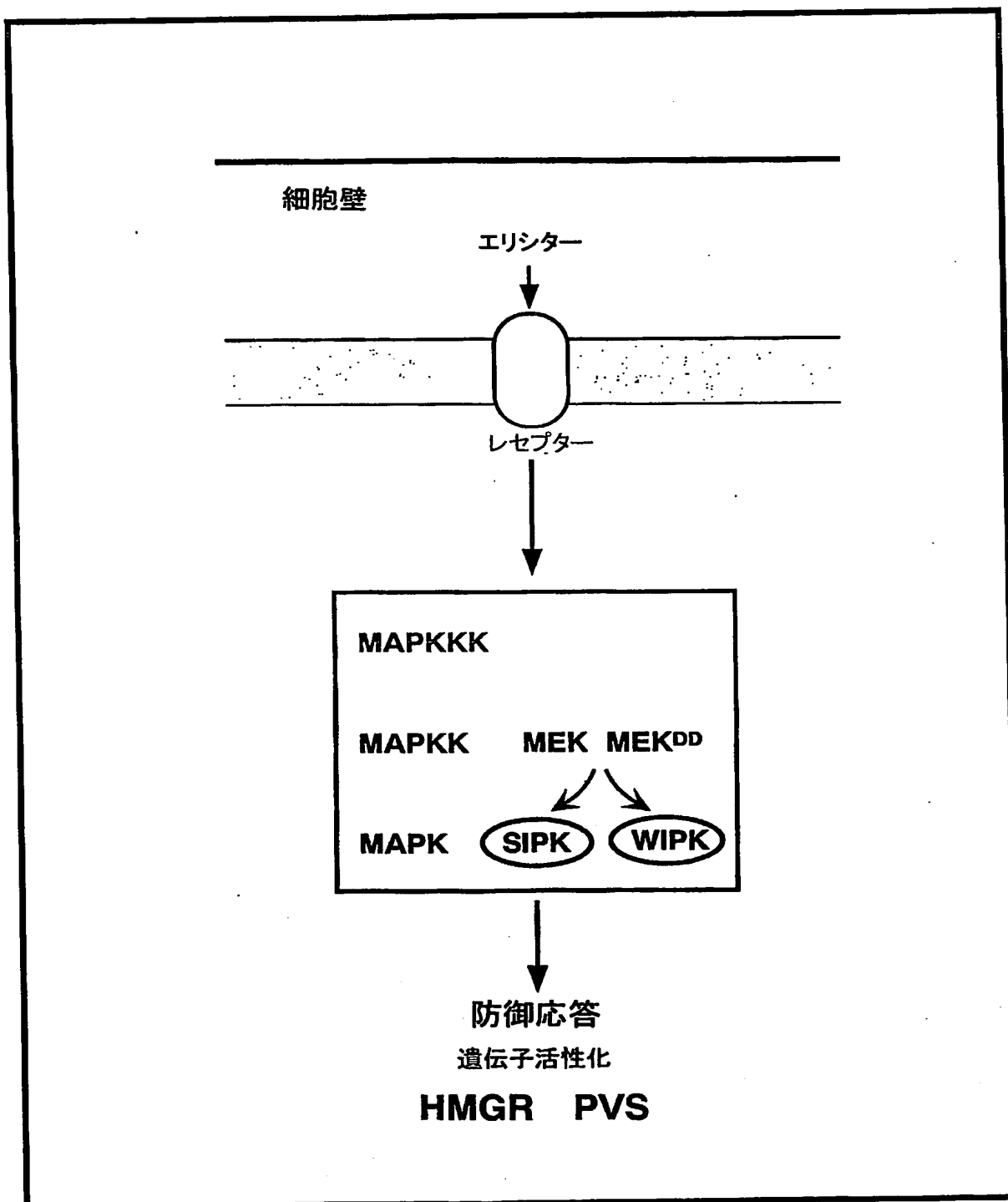




Fig. 2 1

ATGCGACCTCTTCAACCACCCCCACCAGCTGCCAACTCCACCTCCTCCGCCGCCGCATCATC  
CATGCCTCCTCCCTCTTCCGCCGGACAACGCAGTCGTCCCCGGCGTCGTA CTGATTTGACCC  
TTCCTCTTCCTCAACGTGACGTTGCTCTTGCTGTTCTCTCCCCCTTCTCCAACCTCCGCTC  
CTTCTCTTCCTCATCCTCATCTTCTCCCCGCTTCTTACCCCTTTACATTTCTCTGAGCTCG  
AGAGGGTTAATCGCATCGGTAGTGGCACCGGAGGTA CTGTTTACAAGGTTCTACATCGTCCC  
ACTGGCAGACTCTATGCTTTGAAAGTTATCTATGGTAACCATGAGGATTCTGTCCGTCTCCAG  
ATGTGCCGTGAGATCGAGATTCTCCGAGATGTAGACAACCCTAACGTCTGTTAGGTGTACGA  
TATGTTGATCACAACGGCGAAATCCAAGTTCTTCTTGAGTTTCATGGATAAAGGCTCTCTCG  
AAGGGATCCATATCCCTCTCGAACAACCTCTCTCCGATCTAACTCGACAGGTTCTCTCCGGC  
CTCTACTACCTCCACAGGCGTAAGATTGTTTCACAGAGATATCAAACCTTCTAACCTCTTAATC  
AACTCCAGGCGTGAGGTCAAGATTGCAGATTTTGGGGTCTCCAGAGTTCTCGCACAAACTAT  
GGATCCTTGCAATTCCTCCGTGGGTACCATCGCTTACATGAGTCCCGAGAGAATCAACACAG  
ATCTGAATCACGGACAGTACGACGGATATGCTGGGGACATATGGAGTCTTGGGGTGAGCATC  
TTAGAGTTCTACTTGGAAGGTTCCCCTTCTCTGTGGGGAGACAAGGAGACTGGGCCAGCC  
TTATGTGCGCCATTTGTATGTCGCAGCCTCCTGAGGCACCACTGCTTCCAGGGAGTTT  
AGGGAGTTTATTGCCTGCTGTTTGCAGAGGGATCCTGCTAGGCGGTGGACGGCCGCGCAGC  
TCTTGCGCCATCCCTTCATCACCCAGAATAGCCAGGCACCCACACCGGTCTGCTACTACC  
TCATTGAGTAATCAGGCACATCAATTGTTACCTCCACCTCCTCATTTTTCTTCTTCTTCTT  
CTTGA

MRPLQPPPPAANSTSSAAASSMPPPSAGQRSRPRRRD LTLPLPQRDVALAVPLPLPPTSAPS  
SSSSSSSSPLPTPLHFSELERVNRIGSGTGGTVYKVLHRPTGRLYALKVIYGNHEDSVRLQMCR  
EIEILRDVDNPNVVRCHDMFDHNGEIQVLEFMDKGSLEGIHIPLEQPLSDLTRQVLSGLYYL  
HRRKIVHRDIKPSNLLINSRREVKIADFGVSRVLAQTMDPCNSSVGTIAYMSPERINTDLNHG  
QYDGYAGDIWSLGVSI LEFYLG RFPFSVGRQGDWASLMCAICMSQPPEAPPTASREFREFIAC  
CLQRDPARRWTA AQLLRHPFITQNSPGTHTGPATTSLSNQAHQLLPPPHFSSSSSS

Fig. 2 2

ATGCGACCTCTTCAACCAACCCACCAGCTGCCAACTCCACCTCCTCCGCCGCCGCATCATC  
CATGCCTCCTCCCTCTTCCGCCGACAACGCAGTCGTCCCGGCGTCGTAAGTTGACCC  
TTCTCTTCTCAACGTGACGTTGCTCTTGCTGTTCTCTCCCCCTTCTCCAACCTCCGCTC  
CTTCTCTTCTCATCCTCATCTTCTCCCCGCTTCTTACCCCTTTACATTTCTCTGAGCTCG  
AGAGGGTTAATCGCATCGGTAGTGGCACCGGAGGTACTGTTTACAAGGTTCTACATCGTCCC  
ACTGGCAGACTCTATGCTTTGAAAGTTATCTATGGTAACCATGAGGATTCTGTCCGTCTCCAG  
ATGTGCCGTGAGATCGAGATTCTCCGAGATGTAGACAACCCTAACGTCGTTAGGTGTACGA  
TATGTTTCGATCACAACGGCGAAATCCAAGTTCTTCTTGAGTTTCATGGATAAAGGCTCTCTCG  
AAGGGATCCATATCCCTCTCGAACAACCTCTCTCCGATCTAACTCGACAGGTTCTCTCCGGC  
CTCTACTACCTCCACAGGCGTAAGATTGTTTCACAGAGATATCAAACCTTCTAACCTCTTAATC  
AACTCCAGGCGTGAGGTCAAGATTGCAGATTTTGGGGTCTCCAGAGTTCTCGCACAAAGATAT  
GGATCCTTGCAATGACTCCGTGGGTACCATCGCTTACATGAGTCCCGAGAGAATCAACACAG  
ATCTGAATCACGGACAGTACGACGGATATGCTGGGGACATATGGAGTCTTGGGGTGAGCATC  
TTAGAGTTCTACTTGGGAAGGTTCCCTTCTCTGTGGGGAGACAAGGAGACTGGGCCAGCC  
TTATGTGCGCCATTTGTATGTCGCAGCCTCCTGAGGCACCACTGCTTCCAGGGAGTTT  
AGGGAGTTCAATTGCCTGCTGTTTGCAGAGGGATCCTGCTAGGCGGTGGACGGCCGCGCAGC  
TCTTGCGCCATCCCTTCATCACCCAGAATAGCCCAGGCACCCACACCGGTCCTGCTACTACC  
TCATTGAGTAATCAGGCACATCAATTGTTACCTCCACCTCCTCATTTTTCTTCTTCTTCTT  
CTTGA

MRPLQPPPPAANSTSSAAASSMPPPSAGQSRPRRRRTDLTLPLPQRDVALAVPLPLPPTSAPS  
SSSSSSSSPLPTPLHFSELERVNRIGSGTGGTVYKVLHRPTGRLYALKVITYGNHEDSVRLQMCR  
EIEILRDVDNPNVVRCHDMFDHNGEIQVLLFMDKGSLEGIHIPLEQPLSDLTRQVLSGLYYL  
HRRKIVHRDIKPSNLLINSRREVKLADFGVSRVLAQDMDPCNDSVGTIAYMSPERINTDLNHG  
QYDGYAGDIWSLGVSILEFYLGFRFPFSVGRQGDWASLMCAICMSQPPEAPPTASREFREFIAC  
CLQRDPARRWTAQAQLLRHPFITQNSPGTHTGPATTSLSNQAHLPPPPHFSSSSSS

Fig. 2 3

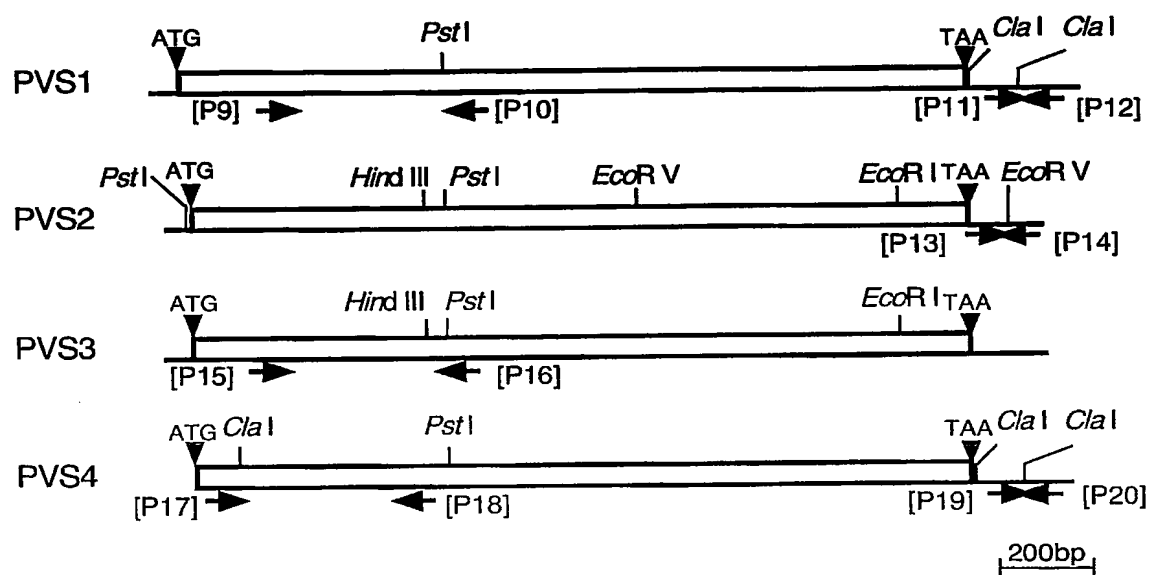


Fig. 2 4

名前	プライマー配列
PVS3-1 (-2334) : F	5'-CGGAATTCCTTGTAATCCTTATTTAGGATTA-3' 配列番号 2 5
PVS3-2 (-1337) : F	5'-CGGAATTCGTCCGCCCTTACTATTCCCATC-3' 配列番号 2 6
PVS3-3 (-1287) : F	5'-CGGAATTCCTTTATAATAGTGCACTCATGCT-3' 配列番号 2 7
PVS3-4 (-1237) : F	5'-CGGAATTCGCTATATTTTTCAAGTTGAAG-3' 配列番号 2 8
PVS3-5 (-1187) : F	5'-CGGAATTCGACGCCATTGAAGGAAGAAAAA-3' 配列番号 2 9
PVS3-6 (-1137) : F	5'-CGGAATTCACCTTCTTGGTCCCTTCGAGGC-3' 配列番号 3 0
PVS3-7 (-1087) : F	5'-CGGAATTCACAAAAAAGACAGACGGT-3' 配列番号 3 1
PVS3-8 (-836) : F	5'-CGGAATTCGTTATATAGTTTTAAAAAAA-3' 配列番号 3 2
PVS3-9 (-584) : F	5'-CGGAATTCGATTTATAACACGATGCGGGTG-3' 配列番号 3 3
PVS3-10 (-332) : F	5'-CGGAATTCCTTACTATATATTAAGTCCAC-3' 配列番号 3 4
PVS3 : R	5'-CCATCGATTCCTCTTCATTGTAAAGGGGA-3' 配列番号 3 5

Fig. 2 5

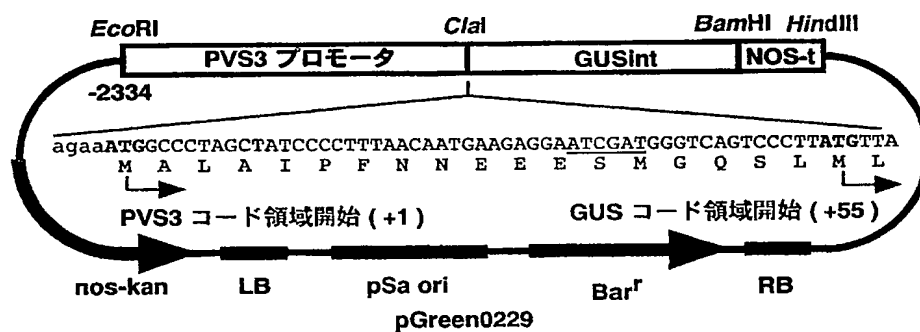


Fig. 2 6

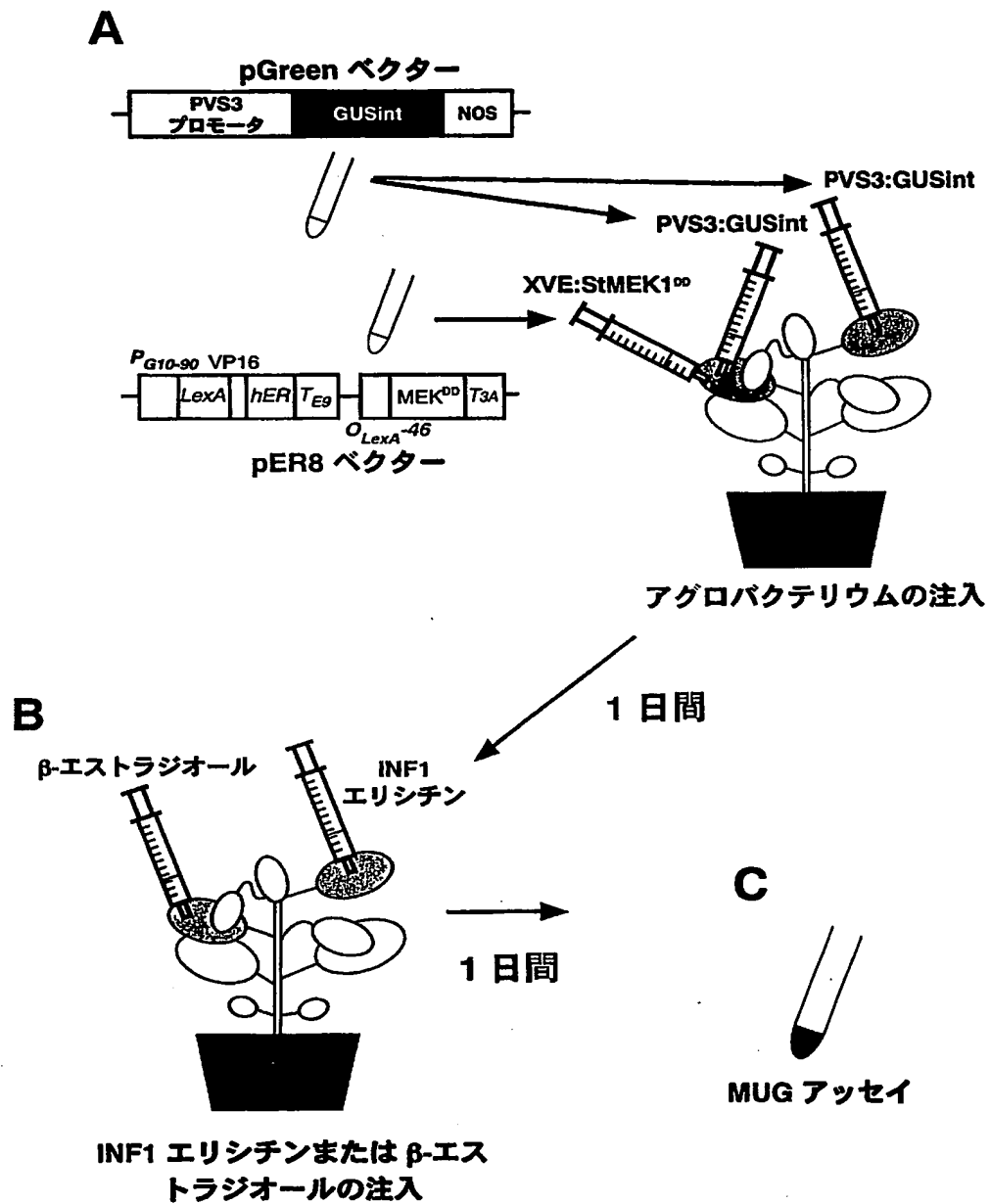


Fig. 2 7

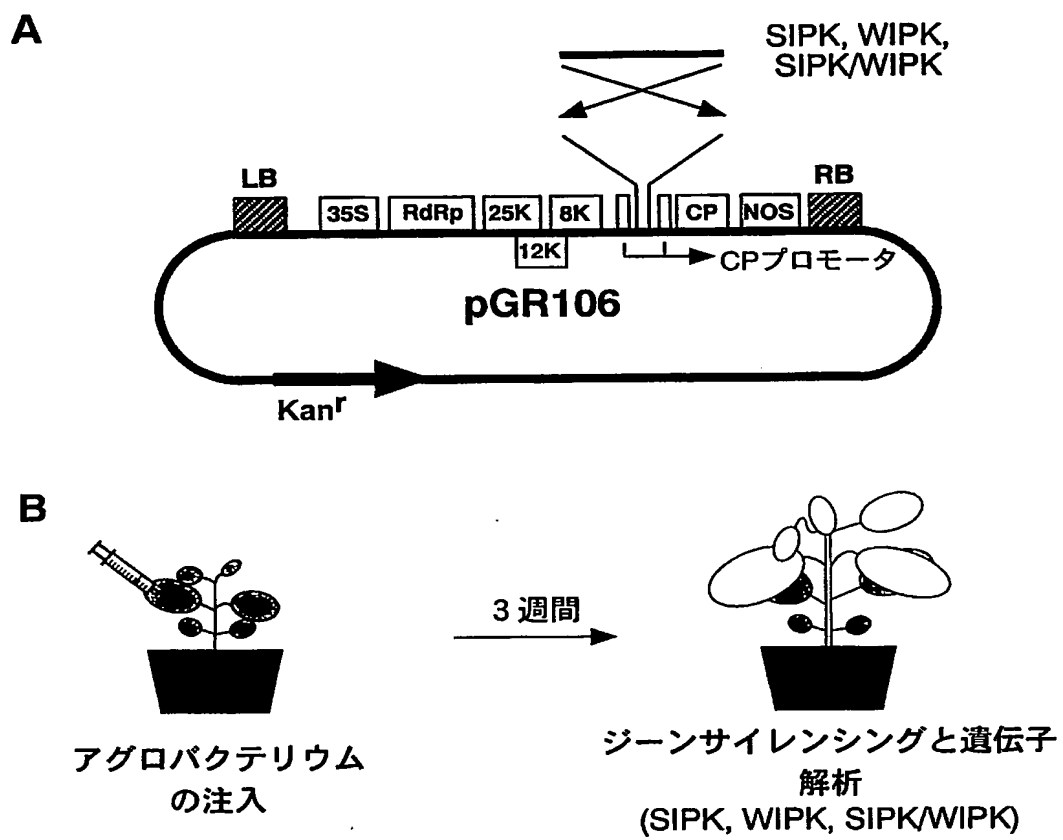


Fig. 2 8

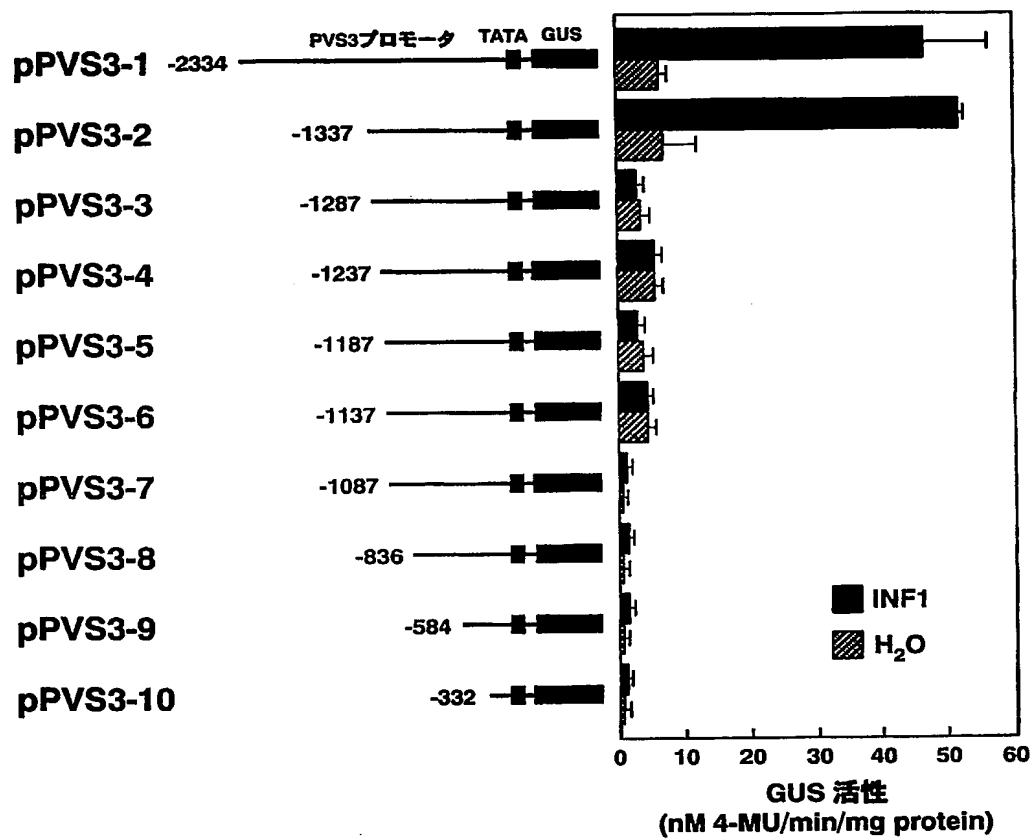




Fig. 2 9

-2648 ctcttctgttgatgtgctatagctcttttatatagcgtctattcatgttgtaatttggcc -2589  
 -2588 tctactttaatttttttcaacctaaaccaagctacaataatgtgtaatgatactaatttg -2529  
 -2528 actcacataatagcatggtagtagaagagtcacttgaaagagtatactgaagagtattaa -2469  
 -2468 aaatataatttctaagaattttcgaagattcaattataattgatcaagaagtgataagag -2409  
 -2408 ccttcnacaacaacgtaaaagtttggtagcctctatanatgactatgaaaaatagccaaaa -2349  
 -2348 aaaaattcaaattcgaattcttgaatccttatttaggattattgcgaccatcacttgtg -2289  
 -2288 ggtgccttacttgactaaatatttgattaaacattaatttttggtcagtggatatacatg -2229  
 -2228 ccactcaatttttaataaatttagtgatcccttacgatcttaaaaaattgtatttttgtg -2169  
 -2168 tgtaatgtcaacttttggttcaaattgtctaataataaagtatttaattccaacagtattag -2109  
 -2108 aattttattttctaagatcactcttacggctcttaccactgaaagattaaaattctaaccaa -2049  
 -2048 gaatttgaaactttaaatagtactttgaattttacttgccgtttgaattttatgtacatg -1989  
 -1988 cttagaataaattaggtcctcatgtagtcaactttaagaaaattacaatgttacgtttctaa -1929  
 -1928 caagaacaaaatttgactctagatttttaatttttttttttaaaaaaaactaaatactc -1869  
 -1868 atccgattcaatttgtttgaaactatgttccaattattaatccgtttcaaaaacaatggt -1809  
 -1808 acattcagatattttaaatacaattaacttaaatcttctcatcatcagtaagaagttttaat -1749  
 -1748 aatcacatgaaggaaagcctgtttggagaaagttatgcgtaaaatattgcataatctctc -1689  
 -1688 tccattgaatttagttacatctggatttgcataaaatcaacatttagtaaaatacagatggc -1629  
 -1628 ttagatgattgaactttgaacaggaaaaataagcgtgcaaaataagccatcaatcttgaac -1569  
 -1568 tttagaaatataatataataattcaataagttactttattggaatagctatagtacggc -1509  
 -1508 ggatttagaattttcattaaagggactctaaaaaatatagtgcctaagatttgaacttg -1449  
 -1448 aaactcaagatgccactaaacaacctctaactctacattcagaaggttcaaaatcaatat -1389  
 -1388 atatagacataattttttaatttttttaaacctccctcgactacctctaggtccgcccct -1329  
 -1328 tactattcccatccgatctcttgggaagcgggggagaaaaattttataatagtgcactcat -1269  
 -1268 gctataattacatactaagattttatgtaatgctataatttttcaagttgaagacggaaa -1209  
 -1208 caatagcattggatcaagacagacgcccattgaaggaagaaaaaacctaaaaaaataaaca -1149  
 -1148 aaaggagagacactttcttggctccctcgaggccatataatcccatataataaaatata -1089  
 -1088 aaacaaaaaaaagacagacggtcgcccaaggaaagaaggcggacgtcactaacggctaa -1029  
 -1028 ccctaactacaaataatgtaattttccaaaacggaactataaggaataaaaaacatgaa -969  
 -968 gattattgagtattattaatttttaaaagacagacgcccactcgaggaaataaggaatcac -909  
 -908 aaggagtaagaaagaaattaaaggcaggttacagtatcatataataataaatttaagttt -849  
 -848 ggttgcatggaagtatatagtttttaaaaaaaataaaattgtccaacaataacttgtcc -789  
 -788 aatttagaaaatctaaaagataatttattattttgtgtttgttttacctcaacatctaata -729  
 -728 acatttctcaaattattaaatttaatatattcaaaaggtaatatagtaataattactctta -669  
 -668 ttatttatttattgtttcttaagatttgtgcaggtcaataataaataactatcgttgaat -609  
 -608 taaggagtagcatcaaagaaattgatttataaacacgatgcgggtggaggagctagaaa -549  
 -548 gttagtacaaatttgggtgcactaagtaacttcatccgtctcaatttatgagattttgtt -489  
 -488 gattcgagacgaaatttaataaagatgatttttttaagttgtaattctaaaacaagtcata -429  
 -428 aaatatttgcactactataataatctcattaaatgtaaatgaatatttttagctaaatta -369  
 -368 ttactactccctccatgtccatattagttgatcatcttactatataattaaactgtccacct -309  
 -308 tactcaatcaataaaaatattaattaaagtttttctatactagatataaaaaatgttattat -249  
 -248 tatttttgataaaagactagaaaagagtatactatttgtatatctacagtgggacgaccagt -189  
 -188 taagtattttagtcaagtaaggcaaccggatggactgcatgcagcacaaggctctc -129  
 -128 accacataaaatactcaatattccttctcttcttcttccatcaacaccttcaccaactaa -69  
 -68 caaattaaaagaaagaaaaaaatctctcagtttccctcacaagctaattagaccggttt -9  
 -8 ccgaagaaATGGCCCTAGCTATCCCTTTAAACAATGAAGAGGAGATTGTTCCGCCCTGTTG 52  
 1 M A L A I P F N N E E E I V R P V 17

Fig. 3 0

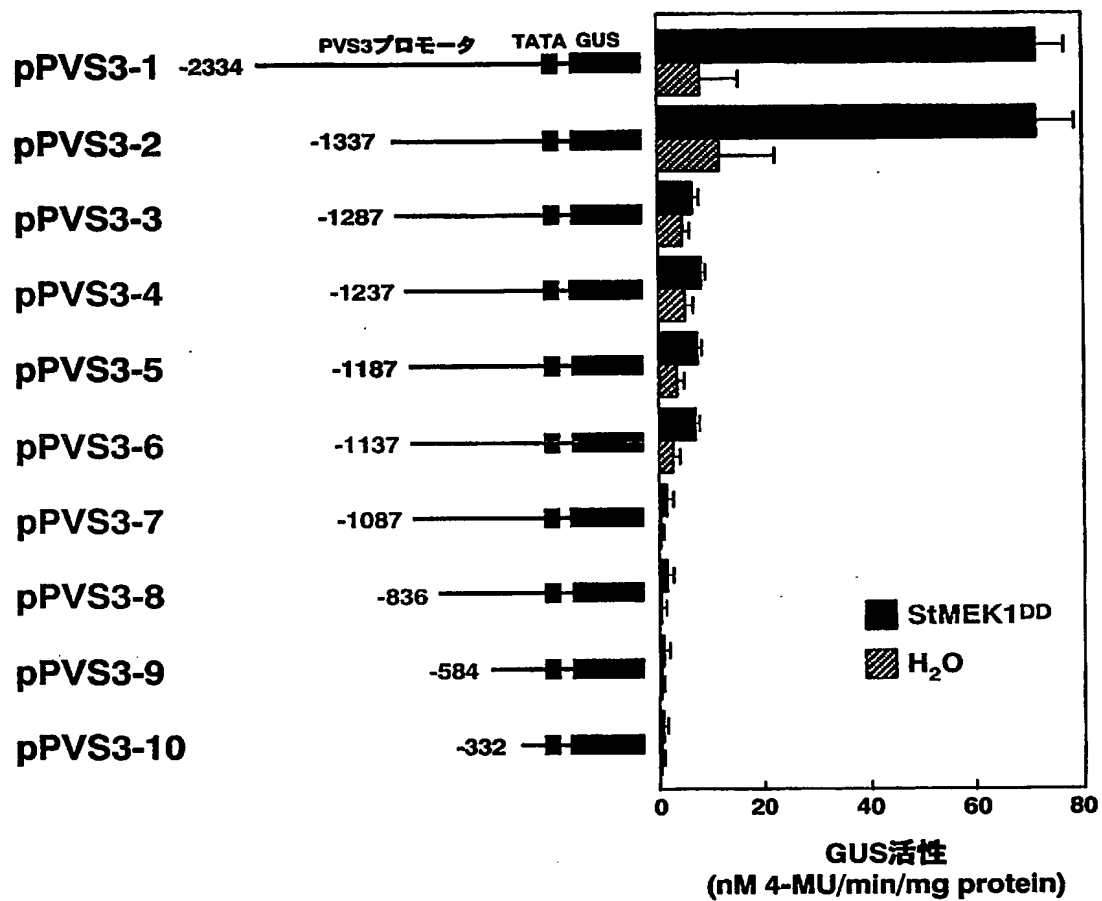
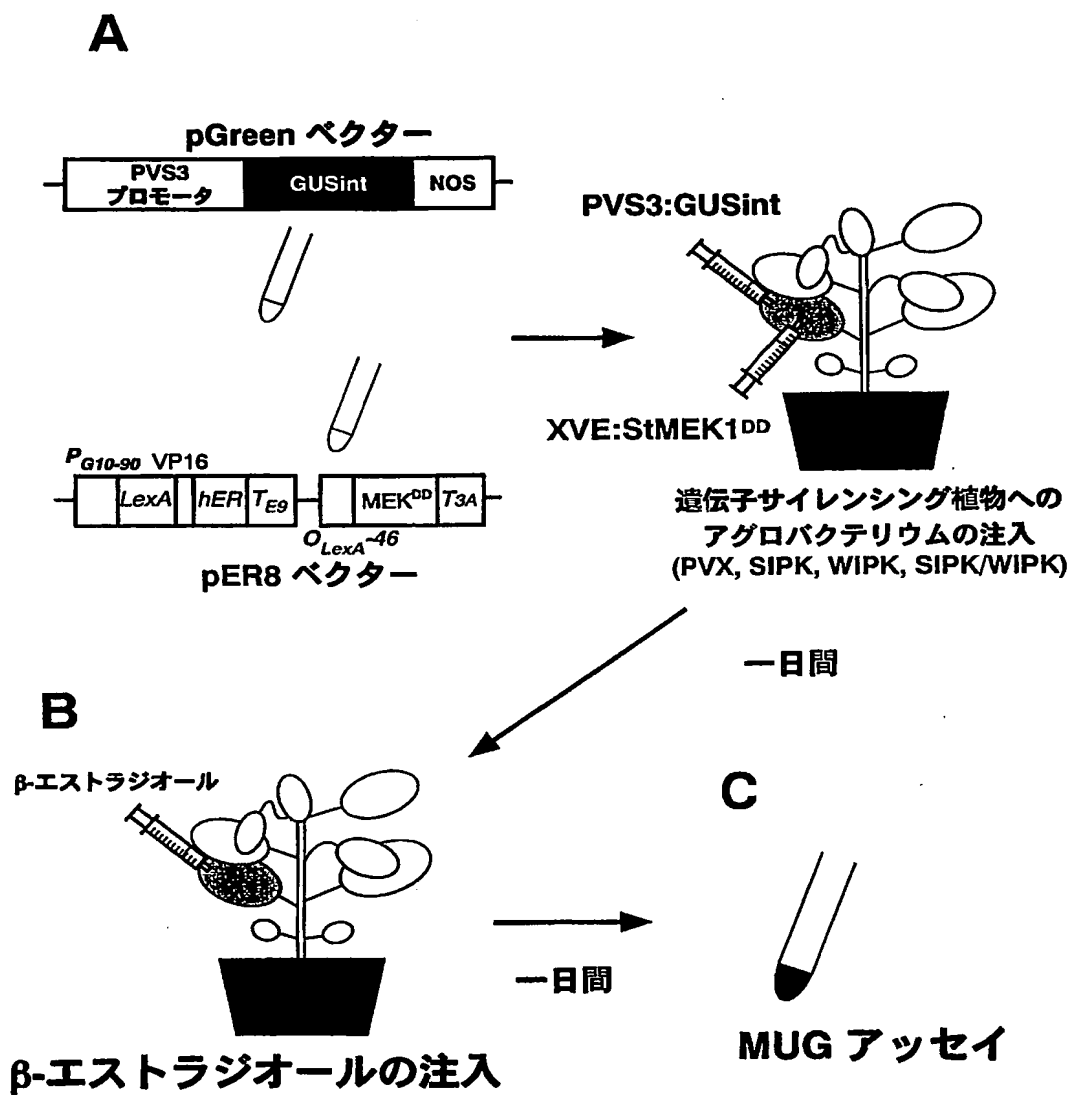


Fig. 3 1





1/25

## SEQUENCE LISTING

<110> NAGOYA INDUSTRIAL SCIENCE RESEARCH INSTITUTE  
YOSHIOKA, Hirofumi

<120> Pathogen-responsive promotor

<130> P0206402

<150> JP P2002-351701

<151> 2002-12-03

<150> JP P2003-294409

<151> 2003-08-18

<160> 39

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2648

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

<220>

<221> misc\_feature

<222> (246)..(246)

<223> n stands for any base

<220>

<221> misc\_feature

<222> (278)..(278)

<223> n stands for any base

<400> 1

ctcttctgtt gatgtgctat agtcttttat atagcgctct attcatgttg taatttggcc 60

tctacttttaa tttttttcaa cctaaaccaa cgtacaataa tgtgtaatga tactaatttg 120

actcacataa tagcatggcg ctagaagagt cacttgaaag agtatactga agagtattaa 180

aaatataatt ctaaagaatt tcgaagattc aattataatt gatcaagaag gtgataagag 240

2/25

ccttcnacaa caacgtaaag ttgggtagc ctctatanat gactatgaaa atagccaaaa 300  
aaaaattcaa attcgaattc ttgtaatcct tatttaggat tattgcgacc atcacttggt 360  
ggcgccttac ttgactaaat atttgattaa acattaattt ttggtcagtg gatatacatg 420  
ccactcaatt ttaaataaat tagtgatccc ttacgatctt aaaaaaattg tatttttggt 480  
tgtaatgtca actttgggtc aaatgtctaa tataataagt attaattcca acagtattag 540  
aattttattt ctaagatcac tcttacggtc ttaccactga aagattaaaa ttctaaccaa 600  
gaatttgaac tttaaatagt acttatgaat ttacttggc gtttgaattt tatgtacatg 660  
cttagaataa ttaggtcctc atgtagtcaa cttaaagaaa attacaatgt tacgttctaa 720  
caagaacaaa ttgactcta gatttttaat ttttttttt taaaaaaaaa cttaatactc 780  
atccgattca atttgtttga aactatgttc caattattaa tccgtttcaa aaacaatgtt 840  
acattcagat atttaaaatc aattaactta aatttctcat catcagtaag aagttttaat 900  
aatcacatga aggaaagcct gtttgagaa agttatgctt aaaatattgc atatatctct 960  
tccattgaat tagttacatc tggatttgca taaatcaac atttagtaaa atacgatggc 1020  
ttagatgatt gaactttgaa caggaaaaat aagcgtgcaa ataagccatc aatcttgaac 1080  
tttagaaata tatatatata attcaataag ttactttatt ggaatagcta tagtgacggc 1140  
ggatttagaa ttttcattaa agggactcta aaaaaatata gtgcctaaga ttggaacttg 1200  
aaactcaaga tgccactaaa caacctctaa tcttacattc agaagggtca aaatcaatat 1260  
atatagacat aattttttta aattttttta acctccctcg actacctcta ggtccgccct 1320  
tactattccc atccgatctc ttgggaagcg ggggagaaaa ttttataata gtgcactcat 1380  
gctataatta catactaaga ttttatgtaa tgctatattt tttcaagttg aagacggaaa 1440  
caatagcatt ggatcaagac agacgccatt gaaggaagaa aaaacctaaa aaaataaaca 1500  
aaaggagaga cactttcttg gtcccttcga ggccatatat ccattaata taaaaatata 1560  
aaacaaaaaa aaagacagac ggtcgcccaa ggaaagaagg cggacgtcac taacggctaa 1620

3/25

ccctaactac aaataatgta attttccaaa aacggaacta taaggaataa aaaacatgaa 1680  
 gattattgag tattattaat ttttaaaaga cagacgccac tgcaggaaat aaggaatcac 1740  
 aaggagtaaa gaaagaaatt aaaggcacgt tacagtatca tataatataa atttaagttt 1800  
 gggtgcattg aagttatata gtttttaaaa aaaaataaaa ttgtccaaca atacttgtcc 1860  
 aatttagaaa atctaaaaga taatttatta ttttgtgtt gttttacctc aacatctaatt 1920  
 acatttctca aattattaaa ttaataatat tcaaaaggta atatagtaat attactctta 1980  
 ttatttatit attgtttctt aagatttgtg caggtaata ataaataact atcgttgaat 2040  
 taaggagta ccatcaaaga aattgattta taacacgatg cgggtggagg gagctagaaa 2100  
 gttagtacaa atttggttgc actaagtact tcatccgtct caatttatga gattttgttt 2160  
 gattcgagac gaaatttaatt aaagatgatt tttttaaagt tgtaattctaa aacaagtcatt 2220  
 aaatatttgc atcactataa taatctcatt aaatgtaaat gaatatitit agctaaatta 2280  
 ttactactcc ctccatgtcc atattagtgt atcatcttac tatatattaa ctgtccacct 2340  
 tactcaatta ataaaatatt aattaaagtt tttctatact agatataaaa atgttattat 2400  
 tatttttgat aaagactaga aagagtatac tatttgtata tctacagtgg gacgaccagt 2460  
 taagtatatt gtagtcaaag taaggcaacc ggatggactg catgcagcac aaaggctctc 2520  
 accactataa atactcaata ttccttctct ttcatctcca tcaacacctt caccaactaa 2580  
 caaattaaaa gaaagaaaaa aaaatctctc agtttcttca caagctaatt agaccggtt 2640  
 ccgaagaa 2648

<210> 2  
 <211> 2000  
 <212> DNA  
 <213> Solanum tuberosum

<400> 2  
 ttatgtaca tgcitagaat aattaggtcc tcatgtagtc aactttaaga aaattacaat 60

4/25

gttacgttct aacaagaaca aatttgactc tagattttta atttttttt tttaaaaaa 120  
aactaaatac tcatccgatt caatttgitt gaaactatgt tccaattatt aatccgttc 180  
aaaaacaatg ttacattcag atatttaaaa tcaattaact taaatttcic atcatcagta 240  
agaagtttta ataatcacat gaaggaaagc ctgtttggag aaagttagc gtaaaatatt 300  
gcatatatct ctccattga attagttaca tctggatttg cataaaatca acatttagta 360  
aaatacgaag gcttagatga ttgaactttg aacaggaaaa ataagcgtgc aaataagcca 420  
tcaatcttga actttagaaa tatatatata taattcaata agttacttta ttggaatagc 480  
tatagtgcag gcgatttag aattttcatt aaagggactc taaaaaata tagtgcctaa 540  
gatttgaact tgaactcaa gatgccacta aacaacctct aatcttcat tcagaagggt 600  
caaaatcaat atatatagac ataattttt aaatttttt taacctcct cgactacctc 660  
taggtccgcc ctactattc ccatccgac tcttggaag cgggggagaa aattttataa 720  
tagtgcactc atgctataat tacatactaa gattttatgt aatgctatat ttttcaagt 780  
tgaagacgga aacaatagca ttgatcaag acagacgcca ttgaaggaag aaaaaaccta 840  
aaaaaataaa caaaaggaga gacactttct tggtccttc gaggccatat atccattaa 900  
tataaaaata taaaacaaaa aaaaagacag acggtcgccc aaggaaagaa ggccgacgtc 960  
actaacggct aaccctaact acaataatg taattttcca aaaacggaac tataaggaat 1020  
aaaaacatg aagattattg agtattatta atttttaaaa gacagacgcc actcgaggaa 1080  
ataaggaatc acaaggagta aagaaagaaa ttaaaggcac gttacagtat catataatat 1140  
aaatttaagt ttggttgcatt tgaagtata tagtttttaa aaaaaataa aattgtccaa 1200  
caatacttgt ccaatttaga aaatctaaaa gataatttat tatttttgt ttgttttacc 1260  
tcaacatcta atacatttct caaattatta aatttaatat attcaaaagg taatatagta 1320  
atattactct tattatttat ttattgtttc ttaagatttg tgcaggtaa taataaataa 1380



5/25

ctatcgttga attaaggag taccatcaaa gaaattgatt tataacacga tgcgggtgga 1440  
 gggagctaga aagttagtac aaatttggtt gcactaagta cttcatccgt ctcaatttat 1500  
 gagattttgt ttgattcgag acgaaattta ataaagatga tttttttaa gttgtaatct 1560  
 aaaacaagtc ataaatattt gcatcactat aataatctca ttaaattgtaa atgaatattt 1620  
 ttagctaaat tattactact ccttccatgt ccatattagt tgatcatctt actatatatt 1680  
 aactgtccac cttactcaat taataaaata ttaattaaag tttttctata ctagatataa 1740  
 aaatgttatt attatitttg ataaagacta gaaagagtat actatttgta tatctacagt 1800  
 gggacgacca gttaagtata ttgtagtcaa agtaaggcaa ccgatggac tgcatgcagc 1860  
 acaaaggctc tcaccactat aaatactcaa tattccttct ctttcatttc catcaacacc 1920  
 ttcaccaact acaaaattaa aagaaagaaa aaaaaatctc tcagtttcct cacaagctaa 1980  
 ttagaccggt ttccgaagaa 2000

<210> 3  
 <211> 1500  
 <212> DNA  
 <213> Solanum tuberosum

<400> 3  
 aattttcatt aaagggactc taaaaaata tagtgcctaa gatttgaact tgaaactcaa 60  
 gatgccacta aacaacctct aatcttacat tcagaagggt caaatcaat atatatagac 120  
 ataatttttt aaattttttt taacctccct cgactacctc taggtccgcc cttactattc 180  
 ccatccgata tcttgggaag cgggggagaa aattttataa tagtgcactc atgtataat 240  
 tacatactaa gattttatgt aatgctatat tttttcaagt tgaagacgga aacaatagca 300  
 ttgatcaag acagacgcca ttgaaggaag aaaaaaccta aaaaaataaa caaaaggaga 360  
 gacactttct tggtccttc gaggccatat atcccattaa tataaaaaata taaaacaaaa 420  
 aaaaagacag acggtcgccc aaggaaagaa ggcggacgtc actaacggct aaccctaact 480

6/25

acaaataatg taattttcca aaaacggaac tataaggaat aaaaaacatg aagattattg 540  
 agtattatta atttttaaaa gacagacgcc actcgaggaa ataaggaatc acaaggagta 600  
 aagaaagaaa ttaaaggcac gttacagtat catataatat aaatttaagt ttggttgcatt 660  
 tgaagttata tagtttttaa aaaaaataa aattgtccaa caatacttgt ccaattttaga 720  
 aaatctaaaa gataatttat ttttttgtgt ttgttttacc tcaacatcta atacatttct 780  
 caaatttatta aatttaatat attcaaaagg taatatagta atattactct tattatttat 840  
 ttattgtttc ttaagatttg tgcagggtcaa taataaataa ctatcgttga attaaggag 900  
 taccatcaaa gaaattgatt tataacacga tgcgggtgga gggagctaga aagttagtac 960  
 aaatttggtt gcactaagta ctcatccgt ctcaatttat gagattttgt ttgattcgag 1020  
 acgaaattta ataaagatga tttttttaaa gttgtaatct aaaacaagtc ataaatattt 1080  
 gcatacttat aataatctca ttaaagttaa atgaatattt ttagctaaat tattactact 1140  
 cccatcatgt ccatattagt tgatcatctt actatatatt aactgtccac ctactcaat 1200  
 taataaaata ttaattaaag tttttctata ctagatataa aaatgttatt attatttttg 1260  
 ataaagacta gaaagagtat actatttgta tatctacagt gggacgacca gttaagtata 1320  
 ttgtagtcaa agtaaggcaa ccggatggac tgcattgcagc acaaaggctc tcaccactat 1380  
 aaatactcaa tattccttct ctttcatttc catcaacacc ttcaccaact acaaaattaa 1440  
 aagaaagaaa aaaaaatctc tcagtttcct cacaagctaa ttagaccggt ttccgaagaa 1500

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1000

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Solanum tuberosum

&lt;400&gt; 4

aaaacggaac tataaggaat aaaaaacatg aagattattg agtattatta atttttaaaa 60

gacagacgcc actcgaggaa ataaggaatc acaaggagta aagaaagaaa ttaaaggcac 120

7/25

gttacagtat catataatat aaatttaagt ttggttgcat tgaagttata tagtttttaa 180  
 aaaaaataa aattgtccaa caatacttgt ccaatttaga aaatctaaaa gataatttat 240  
 tatttttgtt ttgttttacc tcaacatcta atacatttct caaattatta aatttaatat 300  
 attcaaaagg taatatagta atattactct tattatttat ttattgtttc ttaagatttg 360  
 tgcagggtcaa taataaataa ctatcgttga attaaggagg taccatcaaa gaaattgatt 420  
 tataacacga tgcgggtgga gggagctaga aagttagtac aaatttggtt gcactaagta 480  
 ctcatccgt ctcaatttat gagattttgt ttgattcgag acgaaattta ataaagatga 540  
 tttttttaa gttgtaatct aaaacaagtc ataaatattt gcatcactat aataatctca 600  
 ttaaatgtaa atgaatattt ttagctaaat tattactact ccctccatgt ccatattagt 660  
 tgatcatctt actatatatt aactgtccac ctactcaat taataaaata ttaattaaag 720  
 tttttctata ctagatataa aaatgttatt attatttttg ataaagacta gaaagagtat 780  
 actatttgta tatctacagt gggacgacca gttaagtata ttgtagtcaa agtaaggcaa 840  
 ccggatggac tgcattgcagc acaaaggctc tcaccactat aaatactcaa tattccttct 900  
 ctttcatttc catcaacacc ttaccaact acaaaattaa aagaaagaaa aaaaaatctc 960  
 tcagtttctt cacaagctaa ttagaccgtt ttccgaagaa 1000

<210> 5  
 <211> 1125  
 <212> DNA  
 <213> Solanum tuberosum

<400> 5  
 atgcgacctc ttcaaccacc cccaccagct gccaaactcca cctcctccgc cgccgcatca 60  
 tccatgcctc ctccctcttc cgccggacaa cgcagtcgtc cccggcgtcg tactgatttg 120  
 acccttcttc ttctcaacg tgacgttgct ctgtctgttc ctctccccct tctccaacc 180  
 tccgtcctt ctcttcttc atctcatct tctccccgc ttctacccc ttacatttc 240

8/25

tctgagctcg agagggitaa tcgcatcggt agtggcacccg gaggtactgt ttacaaggtt 300  
 ctacatcgtc ccactggcag actctatgct ttgaaagtta tctatggtaa ccatgaggat 360  
 tctgtccgtc tccagatgtg ccgtgagatc gagattctcc gagatgtaga caaccctaac 420  
 gtcgttaggt gtcacgatat gttcgatcac aacggcgaaa tccaagtict tcttgagttc 480  
 atggataaag gctctctcga agggatccat atccctctcg aacaacctct ctccgatcta 540  
 actcgacagg ttctctccgg cctctactac ctccacaggc gtaagattgt tcacagagat 600  
 atcaaacctt ctaacctctt aatcaactcc aggcgtgagg tcaagattgc agattttggg 660  
 gtctccagag ttctcgcaca aactatggat ccttgcaatt cctccgtggg taccatcgct 720  
 tacatgagtc ccgagagaat caacacagat ctgaatcacg gacagtacga cggatatgct 780  
 ggggacatat ggagtcttgg ggtgagcatc ttagagttct actigggaag gttccccttc 840  
 tctgtgggga gacaaggaga ctgggccagc cttatgtgcg ccatttgtat gtcgcagcct 900  
 cctgaggcac caccactgc ttccaggag tttaggaggt tcattgcctg ctgtttgcag 960  
 agggatcctg ctaggcggtg gacggccgcg cagctcttgc gccatccctt catcaccag 1020  
 aatagcccag gcacccacac cggtcctgct actacctcat tgagtaatca ggcacatcaa 1080  
 ttgttacctc cacctcctca tttttcttct tcttcttctt ctgga 1125

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 374

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Solanum tuberosum

&lt;400&gt; 6

Met Arg Pro Leu Gln Pro Pro Pro Pro Ala Ala Asn Ser Thr Ser Ser  
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Ser Ser Met Pro Pro Pro Ser Ser Ala Gly Gln Arg Ser  
 20 25 30

9/25

Arg Pro Arg Arg Arg Thr Asp Leu Thr Leu Pro Leu Pro Gln Arg Asp  
35 40 45

Val Ala Leu Ala Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Thr Ser Ala Pro Ser  
50 55 60

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Pro Leu Pro Thr Pro Leu His Phe  
65 70 75 80

Ser Glu Leu Glu Arg Val Asn Arg Ile Gly Ser Gly Thr Gly Gly Thr  
85 90 95

Val Tyr Lys Val Leu His Arg Pro Thr Gly Arg Leu Tyr Ala Leu Lys  
100 105 110

Val Ile Tyr Gly Asn His Glu Asp Ser Val Arg Leu Gln Met Cys Arg  
115 120 125

Glu Ile Glu Ile Leu Arg Asp Val Asp Asn Pro Asn Val Val Arg Cys  
130 135 140

His Asp Met Phe Asp His Asn Gly Glu Ile Gln Val Leu Leu Glu Phe  
145 150 155 160

Met Asp Lys Gly Ser Leu Glu Gly Ile His Ile Pro Leu Glu Gln Pro  
165 170 175

Leu Ser Asp Leu Thr Arg Gln Val Leu Ser Gly Leu Tyr Tyr Leu His  
180 185 190

Arg Arg Lys Ile Val His Arg Asp Ile Lys Pro Ser Asn Leu Leu Ile  
195 200 205

10/25

Asn Ser Arg Arg Glu Val Lys Ile Ala Asp Phe Gly Val Ser Arg Val  
210 215 220

Leu Ala Gln Thr Met Asp Pro Cys Asn Ser Ser Val Gly Thr Ile Ala  
225 230 235 240

Tyr Met Ser Pro Glu Arg Ile Asn Thr Asp Leu Asn His Gly Gln Tyr  
245 250 255

Asp Gly Tyr Ala Gly Asp Ile Trp Ser Leu Gly Val Ser Ile Leu Glu  
260 265 270

Phe Tyr Leu Gly Arg Phe Pro Phe Ser Val Gly Arg Gln Gly Asp Trp  
275 280 285

Ala Ser Leu Met Cys Ala Ile Cys Met Ser Gln Pro Pro Glu Ala Pro  
290 295 300

Pro Thr Ala Ser Arg Glu Phe Arg Glu Phe Ile Ala Cys Cys Leu Gln  
305 310 315 320

Arg Asp Pro Ala Arg Arg Trp Thr Ala Ala Gln Leu Leu Arg His Pro  
325 330 335

Phe Ile Thr Gln Asn Ser Pro Gly Thr His Thr Gly Pro Ala Thr Thr  
340 345 350

Ser Leu Ser Asn Gln Ala His Gln Leu Leu Pro Pro Pro Pro His Phe  
355 360 365

Ser Ser Ser Ser Ser Ser  
370

&lt;210&gt; 7

11/25

&lt;211&gt; 1125

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; mutant MEK gene

&lt;400&gt; 7

atgacacctc ttcaaccacc cccaccagct gccaaactcca ctcctccgc cgccgcatca	60
tccatgcctc ctccctcttc cgccggacaa cgcagtcgtc cccggcgctg tactgatttg	120
acccttctc ttctcaacg tgacgttgct ctgtctgttc ctctccccct tctccaacc	180
tccgtcctt cctcttctc atctcatct tctccccgc ttcctacccc ttacatttc	240
tctgagctcg agagggtaa tcgcatcggg agtggcaccg gaggtactgt ttacaaggtt	300
ctacatcgtc ccactggcag actctatgct ttgaaagta tctatggtta ccatgaggat	360
tctgtccgtc tccagatgtg ccgtgagatc gagattctcc gagatgtaga caaccctaac	420
gtcgtaggt gtcacgatat gtgcgacac aacggcgaaa tccaagttct tcttgagttc	480
atggataaag gctctctga agggatccat atccctctcg aacaacctct ctccgatcta	540
actcgacagg ttctctccgg cctctactac ctccacaggc gtaagattgt tcacagagat	600
atcaaacctt ctaacctctt aatcaactcc aggcgtgagg tcaagattgc agattttggg	660
gtctccagag ttctgcaca agatatggat ccttgcaatg actccgtggg taccatcgct	720
tacatgagtc ccgagagaat caacacagat ctgaatcacg gacagtacga cggatatgct	780
ggggacatat ggagtccttg ggtgagcatc ttagagttct acttggaag gttccccctc	840
tctgtgggga gacaaggaga ctgggccagc cttatgtgcg ccatttgtat gtcgcagcct	900
ccagaggcac caccactgc ttccaggag tttaggaggt tcattgcctg ctgtttgcag	960
agggatcctg ctaggcggtg gacggccgcg cagctcttgc gccatccctt catcaccag	1020
aatagcccag gcacccacac cggctctgct actacctcat tgagtaatca ggcacatcaa	1080
ttgttacctc caccctctca ttttcttct tcttcttctt ctgga	1125

12/25

<210> 8  
<211> 374  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> mutant MEK

<400> 8

Met Arg Pro Leu Gln Pro Pro Pro Pro Ala Ala Asn Ser Thr Ser Ser  
1 5 10 15

Ala Ala Ala Ser Ser Met Pro Pro Pro Ser Ser Ala Gly Gln Arg Ser  
20 25 30

Arg Pro Arg Arg Arg Thr Asp Leu Thr Leu Pro Leu Pro Gln Arg Asp  
35 40 45

Val Ala Leu Ala Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Thr Ser Ala Pro Ser  
50 55 60

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Pro Leu Pro Thr Pro Leu His Phe  
65 70 75 80

Ser Glu Leu Glu Arg Val Asn Arg Ile Gly Ser Gly Thr Gly Gly Thr  
85 90 95

Val Tyr Lys Val Leu His Arg Pro Thr Gly Arg Leu Tyr Ala Leu Lys  
100 105 110

Val Ile Tyr Gly Asn His Glu Asp Ser Val Arg Leu Gln Met Cys Arg  
115 120 125

Glu Ile Glu Ile Leu Arg Asp Val Asp Asn Pro Asn Val Val Arg Cys



13/25

130	135	140
His Asp Met Phe Asp His Asn Gly Glu Ile Gln Val Leu Leu Glu Phe		
145	150	155 160
Met Asp Lys Gly Ser Leu Glu Gly Ile His Ile Pro Leu Glu Gln Pro		
	165	170 175
Leu Ser Asp Leu Thr Arg Gln Val Leu Ser Gly Leu Tyr Tyr Leu His		
	180	185 190
Arg Arg Lys Ile Val His Arg Asp Ile Lys Pro Ser Asn Leu Leu Ile		
	195	200 205
Asn Ser Arg Arg Glu Val Lys Ile Ala Asp Phe Gly Val Ser Arg Val		
	210	215 220
Leu Ala Gln Asp Met Asp Pro Cys Asn Asp Ser Val Gly Thr Ile Ala		
	225	230 235 240
Tyr Met Ser Pro Glu Arg Ile Asn Thr Asp Leu Asn His Gly Gln Tyr		
	245	250 255
Asp Gly Tyr Ala Gly Asp Ile Trp Ser Leu Gly Val Ser Ile Leu Glu		
	260	265 270
Phe Tyr Leu Gly Arg Phe Pro Phe Ser Val Gly Arg Gln Gly Asp Trp		
	275	280 285
Ala Ser Leu Met Cys Ala Ile Cys Met Ser Gln Pro Pro Glu Ala Pro		
	290	295 300
Pro Thr Ala Ser Arg Glu Phe Arg Glu Phe Ile Ala Cys Cys Leu Gln		
	305	310 315 320

14/25

Arg Asp Pro Ala Arg Arg Trp Thr Ala Ala Gln Leu Leu Arg His Pro  
325 330 335

Phe Ile Thr Gln Asn Ser Pro Gly Thr His Thr Gly Pro Ala Thr Thr  
340 345 350

Ser Leu Ser Asn Gln Ala His Gln Leu Leu Pro Pro Pro Pro His Phe  
355 360 365

Ser Ser Ser Ser Ser Ser  
370

<210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for RT-PCR

<400> 9  
aggagattgt tcgccccata

20

<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for RT-PCR

<400> 10  
tctccatgag tccttacatg

20

<210> 11  
<211> 22  
<212> DNA

15/25

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for RT-PCR

&lt;400&gt; 11

catcgattgt tttgtacatc tg

22

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for RT-PCR

&lt;400&gt; 12

aataatgata caaaaaaaaaa ttaagg

26

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for RT-PCR

&lt;400&gt; 13

tatcaattca ccaaggaaca ct

22

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for RT-PCR

&lt;400&gt; 14

gaagtaatta aatttaaata ttatcaa

27

16/25

<210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for RT-PCR

<400> 15  
ttgtctgctg ctgcttgtgg 20

<210> 16  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for RT-PCR

<400> 16  
tctccatgag tccttacatg 20

<210> 17  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for RT-PCR

<400> 17  
aggacattgt tcgacctgtt 20

<210> 18  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for RT-PCR

<400> 18

17/25

tctccatgag tccttacatg

20

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for RT-PCR

&lt;400&gt; 19

catcccttaa aattataagt attc

24

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for RT-PCR

&lt;400&gt; 20

aataatgata caaaataaat taagg

25

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 2231

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Solanum tuberosum

&lt;400&gt; 21

atggccctag ctatcccctt taacaatgaa gaggagattg ttcgccctgt tgccaatttc 60

tctccaagtc tttgggggtga tcgtttccat tcattctctc tcgacaatca ggtaattact 120

taattaatta ctaattaaat ctttctctat cgcttatatt tggttaatta ctactaatcc 180

caatcatgaa cattttacag gttgctgaaa agtatgctca agagattgaa actttgaagg 240

aacaacaag gagtttgttg tctgctgctg cttgtggaat aacattggct gagaaattga 300

atctgataga cattgttgag cgccttggct tagcttatca ttttgagaaa caaatagatg 360

18/25

atatgttgga tcaaatttac aaagcagatc ccaacttga cgctcatgat ttaaacactt 420  
tatcccttca atttgaata ttaagacaac atggttacaa tatctccaa agtaggtcca 480  
tcatttaaaa caattcacca aaataatacg ttttttctg catgaaaact aattatcttt 540  
tgcttttatt cgatcatgat ccagaatttt tcagcagatt ccaagatgcg aatggcaagt 600  
tcaaggaatg tcttagcaac gacatcaggg gtctattgaa cttatacgaa gcttcacatg 660  
taaggactca tggagaagat attttagaag aggcacttgt tttctccact gctcatcttg 720  
agctgcagc tccacatttg gagtcacctc tgagtaagca agtgactcat gcccttgagc 780  
agtcctcca taagagcatt ccaagagtcg agacgcgcta cttcatctcc atctacgaag 840  
aggaggaatt taagaatgat gtgttgcttc gatttgccaa attggattac aacttactcc 900  
agatgttgca caaacacgaa cttagtgaag tatcaaggta tacagatgtg ttaagttgaa 960  
ttaaaaatac tagtataaat tatttgttga tagtaatttc taagattggg acttattttg 1020  
taggtgggtg aaagatttgg atttgtgac aacgcttcca tatgctaggg atagagcagt 1080  
ggaatgttac ttttggacga tgggagtgtg tgctgaacct caatactctc aggctcgtgt 1140  
catccttgca aagactatag caatgatttc gatagtagat gacacattcg atgcttatgg 1200  
aatagtaaaa gaacttgagg tctacaccga tgccatacaa aggtatggac ttgcctctcc 1260  
aacagttcat ggatttatta gacgggaaac ttactaaatc tctttctgtt ttattaggtg 1320  
ggatattagt caaattgatc gactcccaga atacatgaaa gttagtitta aggctctttt 1380  
ggatctctat gaagattatg aaaaggagtt gtcaaaggat ggcagatccg atgttgtcca 1440  
ctacgcaaaa gaaagagtag gactcactga tttctattta aaaacacttg tatttacctt 1500  
atactatttc ttattatac aattagatct gttatgggag tattgatggg tgaatgtctt 1560  
gtggtttctg ttaaacagat gaaggagatt gtgagaaact atttgtaga agcaaagtgg 1620  
ttcattgagg gatatatgcc gcctgtttct gagtatctta gcaatgcatt agctaccagc 1680  
acatattact tgctaactac aacatcctat ttgggagtga agtcagcaac aaaggaagat 1740

19/25

tttgaatggt tggctacgaa ccctaaaatt ctigaagcca atgtgacatt atgccgagtt 1800  
 gttgatgaca tagcaacgta tgaggtaatt agcatcgcat tacactacat aaatcatctt 1860  
 ataatttaga gttacagtaa ttttaatacaa attgatttca catacttata aatgaattat 1920  
 aattgccatt ccaggttgag aagggtaggg gccaaatcgc aacaggaatt gagtggtata 1980  
 tgagggatta tgacgtatca acagaagtag caatggaaaa attccaagag atggctgaga 2040  
 tagcatggaa ggatgtaaat gaaggaattc ttcgaccaac acctgtctct acagaaattc 2100  
 ttactcgcat tctcaatctt gctcgtatta tagatgtcac ttacaagcac aatcaagatg 2160  
 gatacactca tcccgaaaaa gttctaaaac ctcacatcat tgctttactg gtggactcca 2220  
 ttgagatcta a 2231

<210> 22  
 <211> 1337  
 <212> DNA  
 <213> Solanum tuberosum

<400> 22  
 gtccgccctt actattccca tccgatctct tgggaagcgg gggagaaaat tttataatag 60  
 tgcactcatg ctataattac atactaagat tttatgtaat gctatatatt ttcaagtiga 120  
 agacggaaac aatagcattg gatcaagaca gacgccattg aaggaagaaa aaacctaaaa 180  
 aaataaacia aaggagagac actttcttgg tcccttcgag gccatatatc ccattaatat 240  
 aaaaatataa aacaaaaaaa aagacagacg gtcgccaag gaaagaaggc ggacgtcact 300  
 aacggctaac cctaactaca aataatgtaa ttttccaaa acggaactat aaggaataaa 360  
 aaacatgaag attattgagt attattaatt tttaaaagac agacgccact cgaggaaata 420  
 aggaatcaca aggagtaaag aaagaaatta aaggcacgtt acagtatcat ataataaaa 480  
 ttttaagtttg gttgcattga agttatatag tttttaaaaa aaaataaaat tgtccaacia 540  
 tacttgtcca atttagaaaa tctaaaagat aatttattat tttgtgttg tttacctca 600

20/25

acatctaata catttctcaa attattaaat ttaatatatt caaaaggtaa tatagtaata 660  
 ttactcttat tatttattta ttgtttctta agatttgtgc aggtcaataa taaataacta 720  
 tcgttgaatt aaggaggtac catcaaagaa attgatttat aacacgatgc ggggtggaggg 780  
 agctagaaag ttagtacaaa ttgtgtgca ctaagtactt catccgtctc aatttatgag 840  
 attttgtttg attcgagacg aaatttaata aagatgattt ttttaaagtt gtaatctaaa 900  
 acaagtcata aatatttgca tcactataat aatctcatta aatgtaaag aatattttta 960  
 gctaaattat tactactccc tccatgtcca tattagtga tcatcttact atatatatac 1020  
 tgtccacctt actcaattaa taaaatatta attaaagttt ttctatacta gatataaaaa 1080  
 tgttattatt atttttgata aagactagaa agagtatact atttgtatat ctacagtggg 1140  
 acgaccagtt aagtatatg tagtcaaagt aaggcaaccg gatggactgc atgcagcaca 1200  
 aaggctctca ccactataaa tactcaatat tccttctctt tcatttccat caacaccttc 1260  
 accaactaac aaattaaaag aaagaaaaaa aaatctctca gtttctcac aagctaatta 1320  
 gacccgtttc cgaagaa 1337

<210> 23  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Solanum tuberosum

<400> 23  
 gtccgccctt actattccca tccgatctct tgggaagcgg gggagaaaat 50

<210> 24  
 <211> 1287  
 <212> DNA  
 <213> Solanum tuberosum

<400> 24  
 tttataatag tgcactcatg ctataattac atactaagat tttatgtaat gctatatatt 60



21/25

ttcaagtiga agacggaaac aatagcattg gatcaagaca gacgccattg aaggaagaaa 120  
aaacctaanaa aaataaaca aaggagagac actttcttgg tcccttcgag gccatatatc 180  
ccattaatat aaaaatataa aacaaaaaaaa aagacagacg gtcgccaag gaaagaaggc 240  
ggacgtcact aacggctaac cctaactaca aataatgtaa ttttccaaa acggaactat 300  
aaggaataaa aaacatgaag attattgagt attattaatt tttaaaagac agacgccact 360  
cgaggaaata aggaatcaca aggagtaaag aaagaaatta aaggcacgtt acagtatcat 420  
ataatataaa ttttaagttg gttgcattga agttatatag tttttaaaaa aaaataaaat 480  
tgtccaacaa tacttgtcca atttagaaaa tctaaaagat aatttattat ttgtgtttg 540  
ttttacctca acatctaata catttctcaa attattaaat ttaatatatt caaaaggtaa 600  
tatagtaata ttactcttat tatttattta ttgtttctta agatttgtgc aggtcaataa 660  
taaataacta tcgttgaatt aaggagtag catcaaagaa attgatttat aacacgatgc 720  
gggtggaggg agctagaaag ttagtacaaa ttgtgttga ctaagtactt catccgtctc 780  
aatttatgag attttgtttg attcgagacg aaatttaata aagatgattt ttttaaagtt 840  
gtaatctaaa acaagtcata aatatttga tcactataat aatctatta aatgtaaag 900  
aatattttta gctaaattat tactactccc tccatgtcca tattagtga tcacttact 960  
atatattaac tgtccacctt actcaattaa taaaatatta attaaagttt ttctatacta 1020  
gatataaaaa tgttattatt atttttgata aagactagaa agagtatact attgtatat 1080  
ctacagtggg acgaccagt aagtatatg tagtcaaagt aaggcaaccg gatggactgc 1140  
atgcagcaca aaggctctca ccactataaa tactcaatat tccttctctt tcatttccat 1200  
caacaccttc accaactaac aaattaaaag aaagaaaaaa aaatctctca gtttcctcac 1260  
aagctaatta gacccgttct cgaagaa 1287

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 30

22/25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for PCR

&lt;400&gt; 25

cggaattcctt gtaatcctta ttaggatta

30

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for PCR

&lt;400&gt; 26

cggaattcgt cggcccttac tattcccatc

30

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for PCR

&lt;400&gt; 27

cggaattcctt tataatagtg cactcatgct

30

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for PCR

&lt;400&gt; 28

cggaattcgc tatatTTTTT caagttgaag

30

23/25

<210> 29  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for PCR

<400> 29  
cggaattcga cgccattgaa ggaagaaaaa

30

<210> 30  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for PCR

<400> 30  
cggaattcac tttcttggtc ccttcgaggc

30

<210> 31  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for PCR

<400> 31  
cggaattcaa caaaaaaaaa gacagacggt

30

<210> 32  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for PCR

24/25

<400> 32  
cggaattcgt tatatagttt ttaaaaaaaa

30

<210> 33  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for PCR

<400> 33  
cggaattcga ttataacac gatgcgggtg

30

<210> 34  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for PCR

<400> 34  
cggaattcctt actatatatt aactgtccac

30

<210> 35  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for PCR

<400> 35  
ccatcgattc ctcttcattg ttaaaggga

30

<210> 36  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial

25/25

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for PCR

&lt;400&gt; 36

ttgggcccat gcgacctctt caaccacc

28

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for PCR

&lt;400&gt; 37

gactagtaca aaagagtgtg gaattac

27

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for PCR

&lt;400&gt; 38

gtcgacgaca cagccacgta cgaggt

26

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for PCR

&lt;400&gt; 39

atcgatagac ttcttcgga tgagtg.

26

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15310

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.C1<sup>7</sup> C12N15/11, C12N15/82, A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1<sup>7</sup> C12N15/11, C12N15/29, C12N15/82-15/84

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICSTPLUS, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), PUBMED,  
EMBL/DBJ/Genbank/Geneseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	XIAO F. et al., Expression of 35S::Pto Globally Activates Defense-Related Genes in Tomato Plants, Plant Physiol. (2001), Vol.126, No.4, pages 1637 to 1645	1-22
A	NISHIUCHI T. et al., Roles of Plastid ω-3 Fatty Acid Desaturases in Defense Response of Higher Plants, J.Plant Res. (1998), Vol.111, No.1104, pages 481 to 486	1-22
A	JORDA L. et al., Local and Syntemic Induction of Two Defense-Related Subtilisin-Like Protease Promoters in Transgenic Arabidopssis Plants, Plant Physiol. (2000), Vol.124, No.3, pages 1049 to 1057	1-22

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
05 February, 2004 (05.02.04)

Date of mailing of the international search report  
17 February, 2004 (17.02.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO3/15310

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl<sup>1</sup> C12N15/11, C12N15/82, A01H5/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N15/11, C12N15/29, C12N15/82 - 15/84

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTPLUS, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), PUBMED  
EMBL/DDBJ/Genbank/Geneseq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	XIAO F. <i>et al.</i> , Expression of 35S::Pto Globally Activates Defense-Related Genes in Tomato Plants, Plant Physiol. (2001), Vol.126, No. 4, p.1637-1645	1-22
A	NISHIUCHI T. <i>et al.</i> , Roles of Plastid $\omega$ -3 Fatty Acid Desaturases in Defense Response of Higher Plants, J. Plant Res. (1998), Vol.111, No.1104, p.481-486	1-22
A	JORDA L. <i>et al.</i> , Local and Systemic Induction of Two Defense-Related Subtilisin-Like Protease Promoters in Transgenic Arabidopsis Plants, Plant Physiol. (2000), Vol.124, No. 3, p.1049-1057	1-22

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.02.2004

国際調査報告の発送日

17.2.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JJP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**